

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12N 7/01, 15/31, 15/62, C12P 21/02, C07K 7/10, A61K 39/02 // (C12P 21/02, C12R 1:92)	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/23019 (43) 国際公開日 1994年10月13日(13.10.94)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/00541 (22) 国際出願日 1994年3月31日(31. 03. 94) (30) 優先権データ 特願平5/74139 1993年3月31日(31. 03. 93.) JP 特願平5/245625 1993年9月30日(30. 09. 93) JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 日本ゼオン株式会社(NIPPON ZEON CO., LTD.)(JP/JP) 〒100 東京都千代田区丸の内二丁目6番1号 Tokyo, (JP) 塩野義製薬株式会社(SHIONOGI & CO., LTD.)(JP/JP) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町三丁目1番8号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 斉藤修治(SAITO, Shuji)(JP/JP) 〒235 神奈川県横浜市磯子区洋光台3-35-8 Kanagawa, (JP) 大川節子(OHKAWA, Setsuko)(JP/JP) 〒222 神奈川県横浜市港北区篠原西町17-13-203 Kanagawa, (JP) 佐伯早木子(SAEKI, Sakiko)(JP/JP) 〒146 東京都大田区東矢口1-16-8 Tokyo, (JP) 大澤修朗(OHSAWA, Ikuroh)(JP/JP) 〒161 東京都新宿区中落合3-11-11 Tokyo, (JP) 船戸洋乃(FUNATO, Hirono)(JP/JP) 〒340 埼玉県草加市吉町3-3-7 Saitama, (JP)		入谷好一(IRITANI, Yoshikazu)(JP/JP) 〒612 京都府京都市伏見区深草大亀谷万帖敷町151番地 Kyoto, (JP) 青山茂美(AOYAMA, Shigemi)(JP/JP) 〒528 滋賀県甲賀郡水口町賀生川370-13 Shiga, (JP) 高橋清人(TAKAHASHI, Kiyohito)(JP/JP) 〒520-30 滋賀県栗太郡栗東町小平井71-21 Shiga, (JP) (74) 代理人 弁理士 浅村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.) 〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手ビル331 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : NOVEL POLYPEPTIDE, DNA CODING FOR SAID POLYPEPTIDE, RECOMBINANT VECTOR CONTAINING SAID DNA, RECOMBINANT VIRUS PREPARED USING SAID VECTOR, AND USE THEREOF (54) 発明の名称 新規なポリペプチド、同ポリペプチドをコードするDNA、同DNAを含む組み換えベクター、同組み換えベクターを利用した組み換えウイルス、およびその利用 (57) Abstract <p>A polypeptide exhibiting the antigenicity of <i>Mycoplasma gallisepticum</i>, a fused polypeptide comprising the above polypeptide and, connected to the N-terminus thereof, a signal membrane anchor of a type II outer-membrane polypeptide of a virus that infects birds, or a polypeptide capable of reacting with a mycoplasma-immune serum or a mycoplasma-infected serum and exhibiting a substantially pure antigenicity, respectively having amino acid sequences of about 32 kDa, about 40 kDa, or about 70kDa. The expression with a recombinant virus of a polypeptide modified to such an extent as to exhibit an antigenicity equivalent to that of any of the above polypeptides. The use of a recombinant virus as a live vaccine.</p>		

(57) 要約

マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチド、同ポリペプチドのN末端側に、鳥類に感染するウイルスのタイプ I 外膜ポリペプチドのシグナル膜アンカーが連結している融合ポリペプチド、又はマイコプラズマ免疫血清またはマイコプラズマ感染血清に反応しうる実質的に純粋な抗原性を示すポリペプチドで約 32 キロダルトン、約 40 キロダルトン、約 70 キロダルトンのアミノ酸配列を有するものなど、あるいは同ポリペプチドと同等の免疫原性を示す程度に修飾されたものを組み換えウイルスを用いて発現させること、および組み換えウイルスの生ワクチンとしての利用。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	CZ	チェッコ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド
AT	オーストリア	DE	ドイツ	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	ES	スペイン	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナ・ファソ	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BG	ブルガリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BR	ブラジル	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
CA	カナダ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TD	チャド
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	ML	マリ	TG	トゴ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	IT	イタリア	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	JP	日本	NE	ニジェール	US	米国
CN	中国	KE	ケニア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CS	チェコスロヴァキア	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム

明 細 書

新規なポリペプチド、同ポリペプチドをコードする DNA、同 DNA を含む組み換えベクター、同組み換えベクターを利用した組み換えウイルス、およびその利用

技 術 分 野

本発明は、新規なマイコプラズマ・ガリセプティカムに対して抗原性を示すポリペプチド、同ポリペプチドとシグナル膜アンカーとの融合ポリペプチド、およびマイコプラズマ・ガリセプティカムに対して抗原性を示すポリペプチド、特に宿主細胞膜表面に抗原性を示すポリペプチドを発現することのできる組み換えアビポックスウイルス、並びにその利用に関する。

背 景 技 術

鶏の産卵率や孵化率の低下の原因のひとつにもなっているマイコプラズマ・ガリセプティカム (M y c o - p l a s m a g a l l i s e p t i c u m) に対して抗原性を示すポリペプチドは、抗マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症ワクチンの有効成分として利用できると期待されている。現在のところマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原タンパク質の遺伝子工学的な製造は、大腸菌や酵母を用いた系 (特開平 2 - 1 1 1 7 9 5 号公報など) が知られているが、一般に、菌を用いる系

でのポリペプチドの製造には、第 1 に抗原発現量が少ない、第 2 に宿主由来の発熱性物質が取り除けないなどの問題が指摘されており、いまだ実用に供されていないのが現状である。このため、組み換えウイルスを用いた抗原性を示すポリペプチドの製造や組み換え生ワクチンの研究が進められている。しかし、マイコプラズマ・ガリセプティカムに関しては、該タンパク質をコードする DNA を組み込んだ組み換えウイルスが作製されていない。

ところで、ウイルスのタンパク質には、ウイルスが細胞に感染したとき、発現したタンパク質が細胞表面に輸送され、輸送されたタンパク質が細胞膜表面に呈示される（以下、これら一連の状態を単に細胞表面に呈示するという表現を使うことがある）タンパク質と呈示されないタンパク質とがある。前者の代表的な例としては、ウイルスの外膜に含まれる糖タンパク質がある。このようなタンパク質を発現する組み換えウイルスは、細胞表面に該タンパク質を効率よく呈示することから、この組み換えウイルスを感染させた鶏で高度の抗体価を誘導することが可能となると考えられている（特開平 1 - 1 5 7 3 8 1 号公報）。一方、後者の例としては、マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原タンパク質などのようなバクテリア由来のタンパク質がある。

このようなタンパク質を発現する組み換えウイルスは、細胞膜表面に呈示されるタンパク質量がきわめてわずか

だったり、タンパク質が細胞表面に全く呈示されないために、高い抗体価を誘導することは期待できない。しかし、このようなタンパク質を、遺伝子工学的に細胞膜表面に多量に呈示させることができれば高い抗体価を誘導することができるかと期待される。そこで本来、膜表面に呈示しないタンパク質を膜表面に呈示させるための研究がなされており、例えば、タンパク質を細胞膜表面に分泌させる機能を有するシグナルタンパク質をコードするDNAと分泌したタンパク質を細胞膜表面から離れないように保持する機能を有する膜アンカータンパク質をコードするDNAとを、それぞれ抗原タンパク質をコードするDNAの5'側と3'側に連結させたハイブリッドDNAを組み込んだ組み換えワクチニアウイルスが宿主細胞膜表面に抗原タンパク質を呈示させたという報告がなされている(J. Virol.、64、4776-4783(1990)やMol. Cell. Biol.、6、3191-3199(1986))。しかし、これらの例では、シグナルをコードするDNAと膜アンカーをコードするDNAとを別々に抗原タンパク質をコードするDNAに連結させているため、組み換えウイルスの作製が繁雑となり、実用に適しているとはいえないものであった。

発 明 の 開 示

本発明者らは、かかる従来技術の下で、高い抗原性を

示すマイコプラズマ由来の抗原性を示すポリペプチド、特に多量に細胞膜表面に呈示されるマイコプラズマ・ガリセプティカムに対して抗原性を示すポリペプチド、同ポリペプチドをコードするDNA、同DNAを組み込んだ組み換えウイルス、同ウイルスを利用したワクチンを提供せんとして種々検討の結果、本発明を完成するに至った。

図面の簡単な説明

第1図は、TM-81のオープンリーディングフレームを含むDNA制限酵素切断点地図を、

第2図は、TTM-1NおよびTTM-1Cの構成方法を、

第3図は、pNZ7929-R1の構築方法を、

第4図は、pNZ87Nの構築方法を、

第5図は、pNZ7929-R2の構築方法を、

第6図(A)及び第6図(B)は、pNZ2929XM1の構築方法を、

第7図はTTM-1ポリペプチドのオープンリーディングフレームを含むDNAの制限酵素切断地点地図を、

第8図はTM-67ポリペプチドのオープンリーディングフレームを含むDNAの制限酵素切断地点地図と合成プライマーのORF上の位置を、

第9図(A)および第9図(B)はpNZ7929-67の構築方法を、

第 1 0 図は T M - 6 6 ポリペプチドのオープンリーディングフレームを含む D N A の制限酵素切断地点地図と合成プライマーの O R F 上の位置を、

第 1 1 図 (A) 、第 1 1 図 (B) および第 1 1 図 (C) は p T M 6 6 の構築方法を、

第 1 2 図は p N Z 7 9 2 9 - 6 6 の構築方法を、

第 1 3 図は T M - 1 6 ポリペプチド全長をコードする D N A の制限酵素切断点地図を、

第 1 4 図は T M - 1 6 ポリペプチドのオープンリーディングフレームの制限酵素切断点地図を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の第 1 の側面である新規な高い抗原性を持つマイコプラズマ由来の抗原性を示すポリペプチドとしては、マイコプラズマ・ガリセプティカム免疫血清またはマイコプラズマ・ガリセプティカム感染血清と抗原抗体反応を呈し、マイコプラズマ・ガリセプティカムに由来する第 7 図の制限酵素切断点地図を有する D N A 配列がコードする抗原性を示すポリペプチド、またはその修飾されたものが第 1 に挙げられる。このような抗原性を示すポリペプチドの具体例として、配列番号 1, 1 5, 1 6 および 2 7 に示されるアミノ酸配列をもつ抗原性を示すポリペプチドが例示される。また、ここでいう修飾された抗原性を示すポリペプチドとは、上述のポリペプチドと同等の免疫原性を示す程度にアミノ酸配列が置換・脱落

・欠損・挿入、付加されたものをいい、例えば、配列番号 1 を例にとると、同配列のアミノ酸のアミノ酸配列を有する抗原タンパク質と同等の免疫原性を有し、かつ該ポリペプチドのアミノ酸配列との相同性が 70% 以上、より好ましくは 80% 以上、更に好ましくは 90% 以上のものを指称する。本発明でいう相同性は、DNA シーケンス入力解析システム「DNASIS」（発売元：宝酒造（株））により測定されたものを指標とするものである。

尚、以下本明細書において、配列番号を配列と略称することもある。例えば、配列番号 1 を配列 1 と称することもある。

更に本発明で使用される抗原性を示すポリペプチドをコードする DNA としては、マイコプラズマ・ガリセプティカム免疫血清またはマイコプラズマ・ガリセプティカム感染血清と抗原抗体反応を呈し、マイコプラズマ・ガリセプティカムに由来する抗原性を示すポリペプチド、または同等の抗原性を示す限りにおいて、アミノ酸が欠損・付加・挿入・脱落・置換などの修飾を受けているポリペプチドをコードしているものが挙げられる。

また、本発明の第 2 の側面である組み換えアビポックスウイルスは、マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性ポリペプチドをコードする DNA（以下、抗原 DNA という）または、タイプ II 外膜タンパク質のシグナル膜アンカーをコードする DNA にマイコプラズマ

・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAを連結させたハイブリッドDNAを組み込んだ組み換えアビボックスウイルスであり、本来は細胞膜表面に呈示されないマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチドを多量に細胞膜表面に呈示させるためにはハイブリッドDNAを用いるのが好ましい。

即ち、本発明の第2の側面においては、マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチド（以下、単に抗原タンパク質ということもある）、該ポリペプチドのN末端側に、鳥類に感染するウイルスのタイプII外膜タンパク質のシグナル膜アンカー（以下、単にシグナル膜アンカーという）を連結させた融合ポリペプチド、該抗原タンパク質または該融合ポリペプチドを有効成分とする抗マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症ワクチン、該融合ポリペプチドをコードするハイブリッドDNA、該抗原タンパク質をコードするDNAまたは該ハイブリッドDNAをアビボックスウイルスの増殖に非必須なゲノム領域（以下、非必須領域という）に組み込んだ組み換えアビボックスウイルス、該アビボックスウイルスを有効成分とする抗マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症生ワクチンが提供される。

本発明で第2の側面に係る発明に使用されるというシグナル膜アンカーとは、鳥類に感染するウイルスのタイプII外膜タンパク質を細胞膜表面に輸送し、輸送され

た該タンパク質を細胞膜表面に呈示する機能を有するポリペプチド領域であり、好ましくはヒトへの病原性を示さないウイルス由来のものである。本発明で使用するシグナル膜アンカーをコードするDNA（以下、シグナル膜アンカーDNAという）は、タイプII外膜タンパク質のアミノ末端側の疎水性ペプチド領域をアミノ酸配列により解析することにより、容易に見いだすことが可能である。シグナル膜アンカーの具体例としては、配列番号13に示す配列からなるもの（M o l . C e l l . B i o l . 、 1 0 、 4 4 9 - 4 5 7 （ 1 9 9 0 ））が挙げられる。このDNAは、ニューカッスル病ウイルス（以下、NDVという）のヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ（以下、HNタンパク質という）のアミノ末端側の22アミノ酸をコードするものである。

また、発現した抗原タンパク質の細胞膜への呈示を安定させるためには、シグナル膜アンカーのカルボキシ末端側に親水性のペプチドが存在することが有効であるため、シグナル膜アンカーDNAの下流に親水性ペプチドをコードするDNAが付加していることが好ましい。付加するDNAは、10～50アミノ酸好ましくは20～30アミノ酸分の塩基対である。

本発明に係る抗原タンパク質をコードするDNAの具体例として、第1の側面である4つの配列の他、特開平1-111795号公報に記載されたDNAやそのDNAを含むマイコプラズマ・ガリセプティカムのゲノ

ムDNA断片、配列番号14に示される配列からなる約40キロダルトンの抗原性を示すポリペプチド（以下、TTM-1'ポリペプチドという）をコードするDNA（以下、TTM-1'という）や、TTM-1'と実質的に同等の天然のマイコプラズマ・ガリセプティカム由来のDNA（以下、TTM-1という）などが例示される。このTTM-1及び1'はWO93/24646にて開示されたものである。また、該塩基配列によってコードされる抗原タンパク質と実質的に同等の抗原性を示すかぎりにおいて配列の一部が置換・脱落・欠損・挿入・付加等によって修飾されたポリペプチドをコードするDNAであってもよい。

このようなDNAの採取源としては、マイコプラズマ・ガリセプティカムに属するものであればよく、その具体例としてS6株（ATCC15302）、PG31株（ATCC19610）などが例示される。

本発明の第2の側面において使用されるハイブリッドDNAは、上記シグナル膜アンカーDNAと抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAとが連結されたものであり、本発明の融合ポリペプチドは、前記ハイブリッドDNAによりコードされるポリペプチドであって、ポリペプチド分子内にシグナル膜アンカー部分と抗原性を示すポリペプチド部分とを含むポリペプチドである。ハイブリッドDNAは、常法、例えばシグナル膜アンカーDNAの3'末端と抗原タンパク質をコードするDNA

の 5' 末端とが結合可能な制限酵素切断断片となるようにし、両者をリガーゼで連結する方法や適当なリンカーを挟んで両 DNA をリガーゼで連結する方法などにより作製される。また、シグナル膜アンカーと抗原性を示すポリペプチドとがひとつのポリペプチドとして発現する限りにおいてシグナル膜アンカー DNA と抗原性を示すポリペプチドをコードする DNA との間に、例えば、親水性ペプチドをコードする DNA、他の抗原タンパク質をコードする DNA、リンカー DNA などが含まれたものであっても良い。本発明の融合ポリペプチドは、後述する組み換えアビボックスウイルスを鶏胎児繊維芽細胞（以下、CEF 細胞という）や発育鶏卵しょう尿膜細胞などの培養細胞にて培養し、クロマトグラフィー、塩析による沈澱、密度勾配遠心等から任意に選択した方法により、目的とする抗原性を示すポリペプチドが精製される。こうして得られた融合ポリペプチドは、後述するようにコンポーネントワクチンとして用いることができる。

本発明の組み換えアビボックスウイルスは、アビボックスウイルスの非必須領域に上述の DNA 又はハイブリッド DNA を組み込んだ組み換えアビボックスウイルスである。本発明の組み換えアビボックスウイルスの構築方法は、常法、例えば特開平 1-168279 号公報に記載の方法に従えばよい。即ち、まず、アビボックスウイルスの非必須領域を必要に応じて同非必須領域にプロモーターを挿入した DNA 断片を組み込んだ第一の組み

換えベクターが構築される。

本発明で用いるアビボックスウイルスの非必須領域としては、クエイルボックスウイルスのTK遺伝子領域、七面鳥ボックスウイルスのTK遺伝子領域や特開平1-168279号公報に記載されたDNA断片が挙げられ、好ましくは、前記公報記載の約7.3KbpのEcoRI断片、約5.2KbのHindIII断片、約5.0KbpのEcoRI-HindIII断片、約4.0KbpのBamHI断片と相同組み換えを起こす領域である。

本発明で用いるベクターとしては、例えばpBR322、pBR325、pBR327、pBR328、pUC7、pUC8、pUC9、pUC19などのプラスミド、λファージ、M13ファージなどのファージ、pHC79 (Gene, 11, 第291頁, 1980年)などのコスミドが例示される。

本発明で用いられるアビボックスウイルスは、鳥類に感染するウイルスであれば特に限定されない。このようなウイルスの具体例としては、ピジョンボックスウイルス、フォウルボックスウイルス（以下、FPVという）、カナリーボックスウイルス、七面鳥ボックスウイルスなどが例示されるが、好ましくは七面鳥ボックスウイルス、ピジョンボックスウイルス、FPVであり、より好ましくはピジョンボックスウイルス、FPVである。とりわけ好ましいアビボックスウイルスの具体例としては、

A T C C V R - 2 5 1、A T C C V R - 2 4 9、
A T C C V R - 2 5 0、A T C C V R - 2 2 9、
A T C C V R - 2 8 8、西ヶ原株、泗水株、C E V A
株、C E V A株由来のウィルスのうち鶏胚繊維芽細胞に
感染したときに大きいプラークを形成するウィルス株な
どのごときF P Vや、N P株（鶏胎化鳩痘毒中野系株）
などのように鶏痘生ワクチン株として使用されるF P V
と近縁のウィルスなどが例示される。これらの株はいず
れも市販されているなど、容易に入手することができる。

ついで、前記第一の組み換えベクターの非必須領域内
に上述の抗原DNA、またはハイブリッドDNAを組み
込んだ第二の組み換えベクターを構築する。通常、ハイ
ブリッドDNAを用いる場合には、その上流にプロモー
ターを組み込む。使用されるプロモーターは、合成・天
然を問わずA P Vが保有する転写の系でプロモーターと
して有効に機能しうるものなら如何なる塩基配列のもの
でも良く、チミジンキナーゼをコードする
A P V遺伝子のプロモーターなどA P V固有のプロモー
ターはもちろんのこと、A P V以外のウィルス由来の
DNAや真核生物もしくは原核生物由来のDNAであっ
ても上記条件を満たす限り当然本発明に使用可能である。
このようなプロモーターの具体例としては、例えば
J. V i r o l. , 5 1, 第662～669頁（198
4年）に例示されるようなワクチニアウィルス（以下、
V Vと称すこともある）のプロモーター、具体的には7.

[illegible]

また、組み換えウイルスの検出が容易であるという点からβ-ガラクトシダーゼをコードするDNAなどのマーカーDNAも組み込むことができる。

組み換えアビポックスウイルスの作製は、予めアビポックスウイルスを感染させた動物培養細胞に上記の第二

の組み換えベクターを移入し、ベクターDNAとウイルスゲノムDNAとの間で相同組み換えをおこさせればよい。ここで用いられる動物培養細胞は、アビポックスウイルスが増殖可能なものであれば良く、その具体例としてはCEF細胞や発育鶏卵しょう尿膜細胞などが例示される。

宿主細胞に感染しているウイルスからブランクハイブリダイゼーションなどの方法により目的とする組み換えアビポックスウイルスを単離し、更にブランクアッセイなどにより純化することができる。

上記の方法により構築された本発明の組み換えウイルスは抗マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症生ワクチンとして鳥類に接種することができる。

本発明の生ワクチンの調製方法は特に限定されないが、例えば次の方法によって調製される。本発明の組み換えウイルスを該ウイルスが生育することのできる細胞（以下、宿主細胞という）に感染させ、増殖させたのち、細胞を回収し破碎する。この細胞破碎物を遠心分離機によって遠心分離チューブ中で沈澱物と組み換えウイルスを含有する高力価上清とに分離する。得られた上清は、実質的に宿主細胞を含まず、細胞培養培地と組み換えウイルスを含んでおり、生ワクチンとして使用することができる。この上清には薬理学的に問題のないキャリアー、例えば生理食塩水などを添加し、希釈することもできる。また、この上清は凍結乾燥しても生ワクチンとして使用

できる。本発明の生ワクチンの家禽への投与方法は特に限定されず、例えば皮膚に引っかき傷をつけて生ワクチンを接種する方法、注射により接種する方法、飼料や飲み水に混合して経口投与する、エアロゾルやスプレーなどにより吸入させる方法などが挙げられる。生ワクチンとして使用するには、通常の生ワクチンの使用と同様でよく、例えば、ニワトリ1羽当たり $10^2 \sim 10^8$ プラーク・フォーミング・ユニット（以下、PFUという）程度を接種する。注射により接種する場合、通常0.1 ml程度の生理食塩水などの等張溶媒に本発明の組み換えウイルスを懸濁して用いることができる。本発明の生ワクチンは、普通の条件下で保存、使用することが可能である。例えば、本発明の組み換えウイルスを凍結乾燥すれば、室温（ $20 \sim 22^\circ\text{C}$ ）での保存が可能である。また、ウイルスの懸濁液を $-20 \sim -70^\circ\text{C}$ 下で凍結させ、保存することも可能である。

一方、本発明のコンポネントワクチンは、本発明に係る抗原性を示すポリペプチド、特に融合ポリペプチドを有効成分とするものであり、家禽への投与方法は前記生ワクチンと同様である。投与量は、通常、1羽当たり $1 \mu\text{g} \sim 1 \text{mg}$ 程度である。

かくして本発明によれば、マイコプラズマ・ガリセプチカム抗原性を示すポリペプチド、同ポリペプチドとシグナル膜アンカーとの融合ポリペプチドが得られ、特に、この融合ポリペプチドは抗マイコプラズマ・ガリセ

プティカム感染症ワクチンとして有用である。また、該融合タンパク質をコードするDNAを利用することにより、マイコプラズマ・ガリセプティカム抗原性を示すポリペプチドを宿主細胞膜表面に呈示することができる組み換えアビボックスウイルスが得られ、該組み換えアビボックスウイルスは、強力な抗マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症生ワクチンとして有用である。さらに、本発明の新規な抗原性を示すポリペプチドおよびそれをコードするDNAはそれぞれコンポーネントワクチン、生ワクチンとして利用できる。

実 施 例

以下本発明を実施例および参考例により説明するが、本発明は勿論これらにより限定されるものではない。

参考例 1

マイコプラズマ・ガリセプティカムが発現しているポリペプチドDNA TTM-1の取得

(1) マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノムDNAの調製

マイコプラズマ・ガリセプティカム S6株を100 mlのPPL0ブロス基礎培地に20%馬血清、5%酵母エキス、1%グルコース、およびpH指示薬としてフェノールレッドを微量加えて調製した液体培地で、37℃3～5日培養した。マイコプラズマ・ガリセプティカムの増殖に従って培養液のpHが下がり、培養液に含ま

れている pH 指示薬の呈色が赤から黄に変化した時点で、培養を終了し、培養液を 8000 G、20 分間遠心し、集菌した。さらに菌体を培養液の 1 / 10 容量の PBS に懸濁し、再び 10,000 rpm × G、20 分間遠心し、集菌した。収集菌体を再び 2.7 ml の PBS に懸濁し、更に、SDS の最終濃度が 1 % となる様に SDS を、さらに 10 μ g の RNase を加え、37 °C 30 分間インキュベートし溶菌した。

溶菌液を等容量のフェノールで 3 回抽出しさらに、エチルエーテルで 3 回抽出を行なった後エタノール沈澱し、マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノム DNA 200 μ g を得た。

- (2) TM-1 DNA をプローブにしたマイコプラズマ・ガリセプティカムのゲノミックサザンハイブリダイゼーション

上記 (1) で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカム DNA 1 μ g を Xba I で消化し、0.6 % 低融点アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルをアルカリ変性液 (0.5 M NaOH、1.5 M NaCl) に 10 分間浸し DNA を変性させ、中和液 (3 M 酢酸ナトリウム pH 5.5) に 10 分間浸して中和の後 6 倍 SSC 液 (0.7 M NaCl、0.07 M クエン酸ナトリウム、pH 7.5) 中でナイロンメンブレンに転写した。風乾の後 80 °C で 2 時間焼き付け、4 倍 SET (0.6 M NaCl、0.08 M Tris-HCl、

4 mM EDTA、pH 7.8) - 10 倍
Denhardt - 0.1% SDS - 0.1%
Na₄P₂O₇ - 50 μg/ml 変性サケ精子DNAと
pUM-1 (特開平2-111795号参照) を常法に
従い標識したものを加えて、68℃ 14時間ハイブリ
ダイゼーションをした。ナイロンメンブレンとX線フィ
ルムを重ね、オートラジオグラフィーで確認したところ、
約3.4 kbpの断片にハイブリダイズしていることを
確認した。

- (3) XbaI消化約3.4 kbp断片のpUC-19へ
のクローニング及びコロニーハイブリダイゼー
ション

上記(1)で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカム
DNA 4 μgを制限酵素XbaIで消化後、0.6%低
融点アガロースゲル電気泳動後、約3.4 kbpの断片
を回収した。この断片を、XbaI消化によって開裂し
たpUC-19トリガーゼによって連結し、この連結し
て得た断片を用いてコンピテントな大腸菌TG1株を形
質転換し、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-
β-D-ガラクトピラノシド0.003%、イソプロピ
ルチオ-β-D-ガラクトピラノシド0.03 mM、お
よび40 μg/ml アンピシリンを含むLB寒天培地で
37℃、15時間培養した。この培地上に生育した白コ
ロニーをナイロンメンブレンに転写し、上記(2)と同様の
方法でハイブリダイゼーションを行ない、オートラジオ

グラフィーで確認したところ、クローニングされていることが判明し、このプラスミドをpUTTM1と名付けた。

- (4) TTM-1がコードするタンパクTTMG1を、TGAが翻訳終結コドンとして読まれないように改変(TGA→TGG)したTTM-1'の作製(第2図参照)

上記(3)で取得したpUTTM-1を制限酵素SacIとEcoRIで消化後0.8%低融点アガロースゲル電気泳動に供し、TTM-1の5'端を含む1.1kbpの断片をフェノール・クロロホルム処理後エタノール沈澱により回収し、回収した断片をM13mp11ファージをSacIとEcoRIで開裂させた断片とリガーゼにより連結した。この反応溶液と、37℃で24時間培養した大腸菌TG1株に最終的に100mMとなるようにIPTGを加えてX-galが2%となるようにさらに加えた溶液とm.o.i.が0.1になるよう混合し軟寒天上に撒いて固化させ、37℃、24時間インキュベートした。出現したファージブランクのうち青変していないファージからTTM-1の1.1kbpDNAを含む組み換えファージTTM-1Nを得た。

同様に、pUTTM-1をEcoRIとEcoRVで消化後、0.8%低融点アガロースゲル電気泳動に供し、TTM-1の3'末端側を含む0.4kbpの断片をゲルより回収し、フェノール・クロロホルム処理後エタノ

ール沈澱により回収し、この断片にM 1 3 m p 1 0 フェージをE c o R I とE c o R Vで開裂させた断片とリガーゼにより連結した。この反応溶液から1 . 1 k b p DNAのクローニングと同様の方法で、T T M - 1 の0 . 4 k b p DNAを含む組み換えフェージT T M - 1 Cを得た。

(5) 各組み換えフェージから一本鎖DNAの調製

上記(4)で得られた二種類の組み換えフェージについて、1 0 0 m l の2 × Y T培地で3 7 °Cで増殖している大腸菌T G 1 にm . o . i . = 0 . 1 になるようにそれぞれ加え、3 7 °Cで5 時間振盪培養後5 0 0 0 Gで3 0 分遠心分離し、大腸菌菌体成分を除いた上清を取得する。この上清に0 . 2 倍量のポリエチレングリコール／塩化ナトリウム混合溶液（2 0 %ポリエチレングリコール# 6 0 0 0、2 . 5 M N a C l）を加え4 °Cで1 時間静置後5 0 0 0 Gで2 0 分遠心分離し、沈澱を回収する。この沈澱を5 0 0 μ l のT E緩衝液（1 0 m M T r i s - H C l、1 m M E D T A、p H 8 . 0）に溶かし、フェノール・クロロホルム抽出後、エタノール沈澱で各組み換えフェージの単鎖DNAを回収した。

(6) 人工合成オリゴヌクレオチドをプライマーとする位置特異的変異体の作製

このようにして得られたDNAには、配列の途中にT G Aがある。このT G Aは、通常の細胞内では、終止コドンとして認識されてしまい、これより後ろに付加し

ている配列を翻訳しなくなる。そこで、TGA部分をメチオニンとして翻訳するようにコドンNNNの第3番目の塩基に当たる塩基アデニンをグアニンに改変するために、次の2つのオリゴヌクレオチドを合成した。

配列 1 7

3' - TACGTTCTTCCTGGCAAACCTTACCACTACTT - 5'

配列 1 8

3' - CTACAAAGAACCTAAATATCA - 5'

配列 1 7 (配列番号 1 7) のオリゴヌクレオチドは TTM-1N の単鎖

DNA と、配列 1 8 のオリゴヌクレオチドは TTM-1C の単鎖 DNA とアニールさせ、Frits

Eckstein らの方法 (Nuc. Acid Res. 8749-8764、1985) によって、目的の変異をおこさせて、得られた組み換えファージを各々

TTM-1N'、TTM-1C' と命名した。得られた TTM-1N'、TTM-1C' ファージ DNA をそれぞれ制限酵素 SacI-EcoRI、

EcoRI-BglII で切断し、0.8% 低融点アガロース電気泳動によって 1.1 kbp、0.4 kbp の断片をアガロースゲルより抽出し、エタノール沈澱で回収した。

一方プラスミド pUTTM-1 も SacI-BglII で切断し、4.8 kbp のベクターを含む断片を 0.8% 低融点アガロースゲル電気泳動から回収し、エタノール沈澱で回収した。こうして得られた 3 つの断

片をリガーゼにより連結し、かくして連結した3つの断片を用いてコンピテントな大腸菌TG1株を形質転換し、目的の位置に変異がおきたTTM-1'を持つプラスミドpUTTM-1'を得た。TTM-1'の塩基配列は、SangarらのDideoxy法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA、74、5463(1977))によれば配列番号14に示す通りであった。これは、M. gallisepticumの40キロダルトンのTTM-1ポリペプチドと実質的に同一のものである。

参考例2 挿入用ベクターpNZ1729Rの構築

NP株のEcoRI断片(約7.3kbp)をpUC18のEcoRI切断部位(マルチクローニング部位の末端)に組み込んでプラスミドpNZ133(約10.0kbp)を得た。このプラスミドから、HpaI-SpeI断片(約3.0kbpのNP株由来断片)を切り出し、クレノー(Klenow)断片により平滑末端とした。またpUC18からEcoRI-HindIII断片(52bpのマルチクローニング部位)を除き、クレノー断片で平滑末端とした。この2つの断片をつないで、プラスミドとし、HpaI-SpeI断片中のEcoRV部位を除いて、そこにpUC18のEcoRI-HindIII断片(52bpのマルチクローニング部位)をHindIIIリンカー(5'-CAAGCTTG-3')とEcoRIリンカー(5'-GGAAATTC-3')を用いて組み込み、

p N Z 1 7 2 9 R を完成させた。

実施例 1

組み換え用プラスミド p N Z 7 9 2 9 - R 1 の構築
(第 3 図 参照)

(1) 合成プロモーターと T T M - 1 ' 遺伝子を結合した
プラスミド p U T T M 1 P の構築

参考例 1 で得た T T M - 1 ' D N A 全長を含むプラス
ミド p U T T M 1 ' (W O 9 3 / 2 4 6 4 6 公報 参照)
のうち T T M - 1 ' タンパク質の開始コドンにあたる
A T G の上流に制限酵素 D r a I 切断部位をつくるため
に、まず次のオリゴヌクレオチドを合成した。

配列 1 9

3 ' - T A T A G A A T T A A A T T T T A C T T A T T C - 5 '

つぎに、p U T T M - 1 ' を制限酵素 S a c I と
E c o R I で消化後約 2 3 0 0 b p の断片を回収し、
M 1 3 m p 1 0 の S a c I と E c o R I で開裂させた断
片と連結し組み換えファージ T T M - 1 ' を得た。上記
オリゴヌクレオチドと単鎖 T T M - 1 ' とをアニールさ
せ、Frits Ecksteinらの方法によって目的の変異をおこ
させた。この変異組み換えファージ D N A を制限酵素
S a c I と E c o R I で消化後約 2 3 0 0 b p の断片を
回収し、再び p U T T M - 1 ' を S a c I と E c o R I
で消化したベクターを含んだ断片にクローニングし、
p U T T M 1 D を得た。

合成プロモーターは配列 - 2 0 と配列 - 2 1 の D N A

を合成し、アニーリングして末端に制限酵素
H i n d III と H i n c II 切断部位ができるように作
製した。

配列-20 5'-AGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCATATAAATAAATAACAATAATTACGGCTAAAAATT
配列-21 3'-AAAAAAAAAAAAAAAAAACCGTATATTTATTATTTATGTTATTAATTAATGCGCATTTTTAA
Hind III

GAAGAACTATTCTAATTTATTGCACTCCTC -3'
CTTTTTCATAAGATTAAATAACCTGAGCAG -5'
Hinc II

最後に、p U T T M 1 D の制限酵素 D r a I と
B g l II による消化回収断片 1 2 0 0 b p と上記合成
プロモーターと p U C 1 8 の H i n d III , B a m H I
開裂断片を連結し、約 4 . 0 k b p のプラスミド
p U T T M 1 P を得た。

(2) p N Z 7 9 2 9 R 1 の構築

(1) において得られたプラスミド p U T T M 1 P を制
限酵素 H i n d III と K p n I で消化後、約 1 3 0 0
b p の断片を回収する。次に、参考例 2 で得た F P V 組
み換え用ベクター p N Z 1 7 2 9 R (E P - A - 0 5 2
0 7 5 3 号) を制限酵素 H i n d III と K p n I で開裂
させた。この二つの断片を連結し、目的の組み換え用ベ
クター p N Z 7 9 2 9 - R 1 (約 1 0 . 3 k b p) を得
た。

(3) 組み換え F P V f N Z 7 9 2 9 - R 1 1 の作製 と純化

単層の C E F に鶏痘生ワクチン株である N P 株を

m. o. i. = 0.1 で感染した。3 時間後、これらの細胞をトリプシン処理で剥がし、細胞懸濁液とした。この懸濁液の 2×10^7 個の細胞と $10 \mu\text{g}$ の組み換え用プラスミド pNZ7929-R1 を混合し、Saline G (0.14 M NaCl, 0.5 mM KCl, 1.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 0.5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.011% グルコース) に懸濁し、室温においてジーンパルサー (Bio-Rad 社) を用いて 3.0 kV cm^{-1} , 0.4 msec, 25°C の条件下でエレクトロポレーションした。プラスミドを導入した細胞を、その後 37°C , 72 時間培養し、3 回の凍結融解によって細胞を溶解し、組み換えウイルスを含むウイルスを回収した。

回収した組み換えウイルスはつぎのようにして選択した。回収したウイルス液を単層の CEF に感染させ生育培地を含んだ 10 ml の寒天溶液を重層した。室温中で寒天を固めたのち、FPV のプラークが出現するまで 37°C で培養後ブルオギャル (Blue gal) を $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度でふくんだ寒天培地を重層し、さらに 48 時間 37°C で培養した。全プラークのうち約 1% のプラークが青く発色した。これらの青いプラークを単離・回収して、さらに同様の操作によって単離・回収を繰り返し、すべてのプラークがブルオギャルで青く染まるまでウイルスの純化を行った。通常、この繰り返し操作は 3 ~ 4

回で終了する。この純化されたウイルスを f N Z 7 9 2 9 - R 1 と名付けた。f N Z 7 9 2 9 - R 1 はドットプロットハイブリダイゼーション、サザンプロットハイブリダイゼーションによって、組み込んだ各 D N A の位置を確認した。

実施例 2 70 K タンパク質 D N A の取得

(1) マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノム D N A の調製

上記参考例 1 (1) と同様にしてマイコプラズマ・ガリセプティカム S 6 株を用いて、マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノム D N A 200 μ g を得た。

(2) ゲノム D N A ライブラリーの作製

(1) で得たマイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノム D N A 40 μ g に制限酵素 A 1 u I を 4 ユニット加え、37 °C、10 分間インキュベートして部分切断した。この部分切断したゲノム D N A を 0.8 % 低融点アガロースゲル電気泳動に供し、約 1.0 k b p ~ 4.0 k b p の鎖長の D N A 断片をゲルより回収し、フェノール処理し、さらにエタノール沈澱により 4 μ g の A 1 u I 部分切断 D N A 断片を得た。

A 1 u I 部分切断 D N A 断片 1.2 μ g に最終濃度 80 μ M になるように S - アデノシル - L - メチオニンを添加し、さらに E c o R I メチラーゼを 20 ユニット加えて、E c o R I 認識配列中のデオキシアデノシン部位をメチル化し、当該配列を E c o R I に対し非感受性と

した。このDNA断片にEcoRIリンカーをリガーゼにより接続し、さらにλgt11 DNAのEcoRI切断断片と混合しリガーゼで連結した。この反応溶液を用い、常法(DNA Cloning, VOL 1, A Practical Approach Edited by D. M. Glover)に従ってインビトロパッケージング(in vitro packaging)を行ない、さらに大腸菌Y1088株(アマシャム社)に形質導入し、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド0.003%、イソプロピルチオ-β-D-ガラクトピラノシド0.03 mMを含むLB寒天培地で37℃12時間培養した。形成したプラークのうち、白プラーク数でライブラリーサイズを見積り、10⁶ pfu(プラークフォーミングユニット)のDNAライブラリーを作成した。

(3) ゲノムDNAライブラリーのイムノスクリーニング

(2) で作製したDNAライブラリーから得たファージを、プラークが1枚の8 cmφプレートに500~1000個生じるように、10 mM MgSO₄水溶液に懸濁した大腸菌Y1090株(アマシャム社)に加え、15分間吸着させた。さらに45℃に加温したLB軟寒天培地を2.5 ml 加え、LB寒天培地に重層し、42℃で3~4時間インキュベートした。ナイロンメンブレンフィルターを10 mM IPTG水溶液に浸し、風乾し

た後、上記プレートに重層し、さらに 37℃で 2～3 時間インキュベートした。インキュベート後、ナイロンメンブレンフィルターをプレートより剝し、TBS (50 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl) でフィルターを洗浄した。さらにフィルターをスキムミルクを 2% 含む TBS に 30 分浸したのち、TBS で 500 倍に希釈した抗マイコプラズマ鶏血清で 1 時間処理をした。その後、TBS に 15 分間浸しフィルターを洗浄し、フィルターはさらに界面活性剤 (Tween 20) を 0.05% 含む TBS に 10～15 分間浸して洗浄した。この工程を 4～5 回繰り返した後、フィルターをニワトリ IgG に対するビオチン化抗体で 60 分間処理した。二次抗体で処理した後、Tween 20 を 0.05% 含む PBS で 5～6 回フィルターを洗浄、これをさらにホースラディッシュペルオキシダーゼ-アビジン D 溶液に浸し、60 分間処理した。処理後、Tween 20 を 0.05% 含む PBS で 5～6 回フィルターを洗浄し、さらに、pH 8.0 の 10 mM Tris-HCl で洗浄後、フィルターを 4-クロロナフトール及び過酸化水素水を含むバッファーに浸した。これら一連の操作によりマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原蛋白を発現しているプラークだけが紫色に発色した。

約 5×10^4 プラークを上記イムノスクリーニングすることで 50 個のポジティブなプラークが得られた。

(4) イムノポジティブ組み換え λ g t 1 1 ファージ

DNA の調製

大腸菌 Y 1 0 9 0 株をアンピシリン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 培地で 37°C 、12 時間前培養し、培養液を 10 倍容量の 10 mM MgSO_4 含有 LB 培地に加えた。次いで (3) で得たイムノスクリーニングでポジティブとなった組み換え λ g t 1 1 ファージを $\text{m. o. i.} = 0.05$ になるように加え、 37°C で 5 ~ 10 時間培養した。大腸菌を溶菌後、 $8,000 \text{ rpm}$ 、10 分間遠心し、上清を得、この上清に等容量の TM バッファー (50 mM Tris-HCl $\text{pH} 7.4$ 、 10 mM MgSO_4) および $0.016 \text{ mg}/\text{ml}$ になるように DNase I を加え、15 分間インキュベートした。これに 0.5 M になるように NaCl を、また、 $0.1 \text{ g}/\text{ml}$ になるようにポリエチレングリコール (PEG 6000) を加え、 0°C で 15 分間振盪した。これを $10,000 \text{ rpm}$ で 10 分間遠心して上清を除き、得られたペレットを $1/100$ 容量の TM バッファーに溶解し、さらに等容量のクロロホルムを加え激しく攪拌した。 $15,000 \text{ rpm}$ で 10 分間遠心し組み換え λ g t 1 1 ファージを水層に集め、ファージ液を得た。

上記ファージ液に最終濃度がそれぞれ 0.025 M 、 1% 、 $1 \text{ mg}/\text{ml}$ になるように EDTA、SDS、プロナーゼ E を加え、 37°C で 4 時間インキュベートした後、液をフェノール抽出し、エタノール沈澱でクローン

化抗原DNA (M-81) を含む λ gt11 ファージ DNA を得た。

(5) 組み換えプラスミド (pM-81) の作製

(4) で得た組み換え λ gt11 ファージDNA を制限酵素 EcoRI で消化後、0.8% 低融点アガロースゲル電気泳動に供した。 λ gt11 ファージのゲノムDNA のクローニングサイトに組み込まれたマイコプラズマ・ガリセプティカム のゲノムDNA 断片は約2.8 kbp の鎖長を示した。このDNA 断片をアガロースゲルより抽出し、さらにフェノール・クロロホルム (1:1) で抽出し、エタノール沈澱で回収した。一方、プラスミド pUC18 を同じく EcoRI で消化した後、フェノール・クロロホルムで抽出し、エタノール沈澱により開裂した pUC18 を回収した。次いで5' 末端リン酸をアルカリフォスファターゼ処理により除去し、pUC18 DNA を再びフェノール・クロロホルム抽出後、エタノール沈澱によってDNA を回収した。

開裂した pUC18 とマイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノム由来の前記 EcoRI 消化物 (約0.8 kbp) をリガーゼにより連結し、かくして連結した断片でコンピテントな大腸菌TG1 株を形質転換し、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド0.003%、イソプロピルチオ- β -D-ガラクトピラノシド0.03 mM、40 μ g/ml アンプシリンを含むLB寒天培地で37℃、15時間培養

した。寒天培地上に生育した形質転換大腸菌のうち白コロニーを $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含む

L B 液体培地で 37°C 、15 時間培養し、ビルンボイムとドーリーの方法 [Nuc. Acid Res. 7 1513 ~ (1979)] でプラスミドを抽出し、

EcoRI で消化後、0.8% 低融点アガロース電気泳動によって、もとのマイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノム由来の EcoRI 断片と同じ長さの DNA 断片を含む組み換えプラスミドを検出し、これを pM-81 と命名した。

(6) M-81 DNA をプローブにしたマイコプラズマ・ガリセプティカムのゲノミックサザンハイブリダイゼーション

上記(5) で取得した pM81 $1 \mu\text{g}$ を EcoRI と HindIII で消化し、0.6% 低融点アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルをアルカリ変性液

(0.5M NaOH、1.5M NaCl) に10分間浸しDNAを変性させ、中和液(3M酢酸ナトリウム pH 5.5) に10分間浸して中和の後6倍SSC液

(0.7M NaCl、0.07Mクエン酸ナトリウム、pH 7.5) 中でナイロンメンブレンに転写した。風乾

の後 80°C で2時間焼き付け、4倍SET (0.6M NaCl、0.08M Tris-HCl、4mM

EDTA、pH 7.8) - 10倍Denhardt - 0.1% SDS - 0.1% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ - $50 \mu\text{g}/$

m 1 変性サケ精子DNAとpM-81（このプラスミド内にM-81遺伝子が含まれている）を常法に従い標識したものを加えて、68℃14時間ハイブリダイゼーションをした。ナイロンメンブレンとX線フィルムを重ね、オートラジオグラフィーで確認したところ、M-81はマイコプラズマ・ガリセプティカムの約5.0 kbpの断片にハイブリダイズしていることを確認した。

(7) EcoRI、HindIII 消化約5.0 kbp断片のpUC19へのクローニング及びコロニーハイブリダイゼーション

上記(6)で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカムDNA 4 μ gを制限酵素EcoRIおよびHindIIIで消化後、0.6%低融点アガロースゲル電気泳動後、約5.5 kbpの断片を回収した。この断片を、EcoRIおよびHindIII消化によって開裂したpUC-19とリガーゼによって連結し、連結した断片でコンピテントな大腸菌TG1株を形質転換し、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド0.003%、イソプロピルチオ- β -D-ガラクトピラノシド0.03 mM、40 μ g/mlアンピシリンを含むLB寒天培地で37℃、15時間培養した。この培地上に生育した白コロニーをナイロンメンブレンに転写し、上記(2)と同様の方法でハイブリダイゼーションを行ない、オートラジオグラフィーで確認したところ、クローニングされていることが判明し、

このプラスミドを p U M - 8 1 と名付けた。

(8) p U M - 8 1 インサート D N A の配列分析

上記 (7) で作製した p U M - 8 1 内に挿入された約 5 . 0 k b p の断片の配列を S a n g e r らの D i d e o x y 法によって解析した。

この断片中に存在するオープンリーディングフレーム (以下 O R F という) の制限酵素切断点地図を第 1 図に示し、この O R F の塩基配列及びそれから推定されるアミノ酸配列を配列番号 1 に示す。この O R F から推定されるポリペプチドを T M - 8 1 ポリペプチドと命名した。

実施例 3

シグナル膜アンカー D N A の下流に T T M - 1 ' タンパク質 D N A が連結したハイブリッド D N A を有する組み換え F P V の構築

(1) 合成プロモーターの p U C 1 8 へのクローニング
(第 4 図参照)

両端に H i n d I I I と B a m H I の制限酵素切断部位をもつ次のような合成プロモータを合成した。

Hind III

配列 22 5' - AGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCATATAAATAATAAATACAATAATTAAATTACGC

配列 23 3' - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCGTATATTTATTTATTTATGTTATTAATTAATGCG

GTAAAAATTGAAAACTATTCTAATTTATTGCACTCG -3'

CATTTTAACTTTTIGATAAGATTAAATAACGTGAGCCTAG -5'

BamHI

この合成 D N A と p U C 1 8 の H i n d I I I ,
B a m H I 開裂断片と連結し、約 2 . 8 k b p のプラス

ミド p U C 1 8 P を得た。

(2) N D V の H N タンパク質をコードする遺伝子と合成プロモーターの連結 (第 4 図参照)

N D V の H N 遺伝子を持つプラスミド X L I I I - 1 0 H を S a c I で完全消化後、A v a I I で部分消化して約 1 8 0 0 b p の断片を 0 . 8 % 低融点アガロースゲル電気泳動によって回収した。この断片の A v a I I 側に B a m H I 切断部位を作るため下記の D N A を合成した。

		<u>BamHI</u>		<u>AvaII</u>	
配列 - 24	5' -	GATCCAGCATG	-	3'	
配列 - 25	3' -	GTCGTACCTG	-	5'	

この合成 D N A と H N を含む約 1 8 0 0 b p の D N A 断片と、p U C 1 8 P を B a m H I および S a c I で完全消化後、2 . 0 % 低融点アガロースゲル電気泳動によって回収した合成プロモーターを含む断片の三断片をリガーゼで連結させて、これら三断片が連結したプラスミドを抽出し、得られた約 4 . 6 k b p のプラスミドを p N Z 8 7 N と命名した。

(3) p N Z 7 9 2 9 - R 1 の A l u I 切断点の

E c o R I 切断点への変換 (第 3 図および第 5 図参照)

配列番号 1 4 の 2 7 9 塩基部分の制限酵素 A l u I 切断部位を E c o R I 切断部位に変換するために以下のオリゴヌクレオチドを合成した。

配列 - 26 5' - GGGATTTCTGAATTCTATGTCT - 3'

p U T T M 1 P を H i n d I I I , K p n I で消化後約 1 3

00bpの断片を回収し、M13mp10のHind III, Kpn Iで開裂させた断片と連結し単鎖組み換えファージを得た。上記オリゴヌクレオチドと単鎖組み換えファージとをアニールさせ、Frits Eckstein等の方法によって目的の変異をおこさせた。この変異組み換えファージDNAを制限酵素Hind III, Kpn Iで消化後約1300bpの断片を回収し、これとpNZ1729Rを制限酵素Hind III, Kpn Iで開裂させた断片とをリガーゼにより連結し、pNZ7929-R1のAlu I切断点がEcoRI切断点へと変換されたプラスミドpNZ7929-R2(約10.3kbp)を得た。

(4) 組み換えFPV用プラスミド

pNZ2929XM1の構築(第6図(A)及び第6図(B)参照)

まず、pNZ87Nを制限酵素Xba Iで完全消化し、クレノーフラグメントで切断点を平滑末端にした後EcoRIリンカー(5'-GG AATTC-3')を加えてリガーゼで連結した。このプラスミドをEcoRI, Hind IIIで消化して約300bpの断片を1.2%低融点アガロースゲル電気泳動によって回収した。次に、pNZ7929R2を制限酵素EcoT22 Iで消化し、EcoRIで部分分解し、TTM-1DNAの一部である約550bpの断片を0.8%低融点アガロースゲル電気泳動によって回収し

た。また、pNZ7929R1を制限酵素EcoT22I, HindIIIで消化し、約9.4kbpの断片を0.8%低融点アガロースゲル電気泳動によって回収した。これらの断片をリガーゼにより連結し、上記の三断片が連結したプラスミドを抽出し、得られた約10.35kbpのプラスミドをpNZ2929XM1と命名した。

(5) 組み換えFPV fNZ2929XM1の作製と純化

実施例1(3)と同様の方法で構築、純化した。

この純化されたウイルスをfNZ2929-XM1と名付けた。fNZ2929-XM1はドットブロットハイブリダイゼーション, サザンブロットハイブリダイゼーションによって、組み込んだ各DNAの位置を確認した。

実施例4

fNZ7929-R1とfNZ2929XM1感染細胞におけるTTM-1ポリペプチドの発現

fNZ7929-R1とfNZ2929XM1がTTM-1ポリペプチドを感染細胞中で発現することを調べるために抗マイコプラズマ・ガリセプティカムS6株血清を用いた免疫蛍光抗体法を行った。fN7929-R1およびfNZ2929XM1をCEFに感染させ、37℃でプラークが出現するまで培養後冷アセトンで固定し、マイコプラズマ・ガリセプティカムS6株で免疫した鶏血清(抗S6)またはマイコプラズマ・ガリセプ

ティカム S 6 株感染鶏血清 (S 6 感染) 及び T T M - 1 ポリペプチド免疫鶏血清 (抗 T T M G - 1) を一次抗体として 1 0 0 ~ 1 0 0 0 倍に希釈して反応させた。これらの培養細胞をさらに、蛍光物質 (F I T C) を結合した抗鶏イムノグロブリンと反応させ、非特異反応部分を洗い流したのち蛍光励起波長光下で顕微鏡観察した。また、アセトン固定を行わなかった感染細胞 (即ち、未固定細胞) についても同様に反応性を調べた。対照ウイルスとして F P V - N P 株, f N Z 2 3 3 7 (特開平 1 - 1 5 7 3 8 1) を用い、対照一次抗体としてニューカッスル病ウイルス免疫鶏血清 (抗 N D V) と S P F 鶏血清 (S P F) を 1 0 0 0 倍で用いた。反応性は表 1 に示した。

表1 組み換えウィルス感染CEFの各種抗血清に対する反応性

感染ウィルス (7位)固定 の有無)	一次抗体にたいする反応性				
	抗S6	感染S6	抗TTM-1	抗NDV	SPF
fNZ2929XM1 (7位)固定)	++	++	++	-	-
(未固定)	+	+	+	-	-
fNZ7929-R1 (7位)固定)	+	+		-	-
(未固定)	±	±	±	-	-
fNZ2337 (7位)固定)	-	-	-	+	-
(未固定)	-	-	-	+	-
NP (7位)固定)	-	-	-	-	-
(未固定)	-	-	-	-	-
- (7位)固定)	-	-	-	-	-
(未固定)	-	-	-	-	-

++ : 強く反応 + : 反応 ± : 弱く反応 - : 反応しない

この結果から、本発明の組み換えウィルスである fNZ7929-R1 および fNZ2929XM1 が感染した細胞は、抗S6、S6感染、抗TTM-1 に反応する。また、fNZ7929-R1 は未固定の完成細胞においても抗S6、S6感染、抗TTMG-1 と反応することがわかった。このことは fNZ2929XM1 は TTMG-1 ポリペプチドを感染細胞中で発現しているばかりではなく、感染細胞表面に TTM-1 ポリペプチドを呈示させていることを示している。

実施例 5

組み換え F P V 接種鶏の抗体誘導能

fNZ7929-R1 および fNZ2929XM1 を

C E F で 3 7 ° C , 4 8 時 間 培 養 後、二 回 凍 結 融 解 を 繰 り 返 し、細 胞 浮 遊 液 を 回 収 し、ウ イ ル ス タ イ タ ー が 10^6 p f u / m l と な る よ う に 調 製 し た の ち 生 後 7 日 の S P F 鶏 (L i n e M , 日 本 生 物 科 学 研 究 所) の 右 翼 膜 に 穿 刺 用 針 で $10 \mu l$ 接 種 し た。接 種 後 全 鶏 発 痘 を 観 察 し、接 種 か ら 2 週 後 に 血 清 を 採 取 し た。採 取 し た 血 清 の 抗 体 価 は E L I S A 法 で 測 定 し た。精 製 し た T T M - 1 ポ リ ペ プ チ ド を $1 \mu g / w e l l$ と な る よ う に バ イ カ ー ボ ネ ー ト バ ッ フ ェ ー に 溶 解 し、9 6 w e l l マ イ ク ロ タ イ タ ー プ レ ー ト に 吸 着 さ せ た 後、ス キ ム ミ ル ク で ブ ロ ッ キ ン グ を 行 っ て そ の 後 の 非 特 異 的 吸 着 を 防 い だ。次 に 各 ウ ェ ル に 被 検 血 清 の 希 釈 液 を の せ た の ち ホ ー ス ラ デ ィ ッ シ ュ パ ー オ キ シ ダ ー ゼ 結 合 抗 鶏 イ ム ノ グ ロ ブ リ ン 抗 体 (ウ サ ギ 抗 体) を 二 次 抗 体 と し て の せ た。充 分 洗 浄 し た の ち、基 質 と し て 2 , 2 ' - ア ジ ノ ジ エ チ ル - ベ ン ズ チ ア ゾ リ ン ス ル フ ォ ネ ー ト を 加 え、イ ム ノ リ ー ダ ー で 4 0 5 n m の 波 長 光 に 対 す る 吸 光 度 で 抗 体 の 相 対 希 釈 倍 率 を 測 定 し た。な お、対 照 一 次 抗 体 に は、抗 T T M - 1 ポ リ ペ プ チ ド 鶏 血 清 を 用 い た。結 果 は 表 2 に 示 す。

表2 fNZ2929XM1接種鶏のTTM-1ポリペプチドに対する抗体価

接種ウイルス	抗TTM-1 ポリペプチド抗体価 (希釈倍率) *
fNZ2929XM1	256
fNZ7929-R1	32
NP	1
—	1
抗TTM-1 抗体	256

* SPF 鶏血清を1 としたときの希釈倍率

** 非接種

この結果から、本発明の組み換えウイルスである、fNZ2929XM1もfNZ2929-R1も共に抗TTM-1ポリペプチド抗体を誘導でき、鶏痘とマイコプラズマ・ガリセプティカム感染症に対して効果的に感染を防御するワクチンとして使用することができることが判った。

実施例 6

TM-67を有する組み換えアビポックスウイルス fNZ7929-67の取得

- (1) TM-67遺伝子をプローブにしたマイコプラズマ・ガリセプティカムのゲノミックサザンハイブリダイゼーション

参考例(1)で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカムDNA 1 μ gをXba Iで消化し、0.6%低融点アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルをアルカリ変性液(0.5M NaOH、1.5M NaCl)に10分間浸しDNAを変性させ、中和液(3M酢酸ナ

トリウム pH 5.5) に 10 分間浸して中和の後 6 倍
SSC 液 (0.7 M NaCl、0.07 M クエン酸ナ
トリウム、pH 7.5) 中でナイロンメンブレンに転写
した。風乾の後 8.0 °C で 2 時間焼き付け、4 倍 SET
(0.6 M NaCl、0.08 M Tris-HCl、
4 mM EDTA、pH 7.8) - 10 倍
Denhardt - 0.1% SDS - 0.1%
Na₄P₂O₇ - 50 µg/ml 変性サケ精子 DNA と
pUM-1 (特開平 2-111795 号参照) を常法に
従い標識したものを加えて、68 °C 14 時間ハイブリ
ダイゼーションをした。ナイロンメンブレンと X 線フィ
ルムを重ね、オートラジオグラフィーで確認したところ、
参考例 1 (2) で確認された断片とは異なる約 3.4
kbp の断片にハイブリダイズしていることを確認した。
(2) XbaI 消化約 3.4 kbp 断片の pUC-19
へのクローニング及び配列分析

参考例 1 (1) で取得したマイコプラズマ・ガリセプテ
ィカム DNA 4 µg を制限酵素 XbaI で消化後、
0.6% 低融点アガロースゲル電気泳動後、上記実施例
6 (1) で確認した約 3.4 kbp の断片を回収した。こ
の断片を、XbaI 消化によって開裂した pUC-19
とりガーゼによって連結し、コンピテントな大腸菌
TG1 株を形質転換し、5-ブロモ-4-クロロ-3-
インドリル-β-D-ガラクトピラノシド 0.003%、
イソプロピルチオ-β-D-ガラクトピラノシド

0.03 mM、40 μ g/ml アンピシリンを含む LB 寒天培地で 37 °C、15 時間培養した。この培地上に生育した形質転換大腸菌のうち白コロニーを 40 μ g/ml アンピシリンを含む LB 液体培地で 37 °C、15 時間培養し、ビルンボイムとドーリーの方法でプラスミドを抽出し、Xba I で消化後 0.8 % 低融点アガロース電気泳動によって、元の MG の Xba I 断片と同じ長さを含む組み換えプラスミドを検出し、pUM67 と名付けた。

pUM67 内に挿入された約 3.4 kbp の断片を Sanger らの Dideoxy 法によって解析した。この断片中に存在するオープンリーディングフレーム (ORF) の制限酵素地図を第 8 図に示し、この ORF の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号 27 に示す。この ORF から推定されるポリペプチドを TM-67 と命名した。

(3) TM-67 の ORF の TGA が翻訳終結コドンとして読まれないように改変 (TGA \rightarrow TGG) した遺伝子を含むプラスミド pTM67 の作製 (第 8 図および第 9 図 (A))

TM-67 の ORF の下流部分に TGA コドンが集中しているので、全ての TGA コドンを含む EcoRI、PstI 断片約 1300 bp を pUM67 から回収し、EcoRI と PstI で開裂させた pUC19 に連結し、PUC T1 (4.0 kbp) を取得した。次に、PUC T1 を鋳型とし、TGA を TGG にポリメラーゼチェー

ンリアクション法（PCR法：Science, 230,
1350～1354（1985））にて変換させるため
に配列番号28～33に示すPCR法用プライマーDNA
Aを合成した。

PCR法に使用した配列番号28～33に相当するプ
ライマー1～6は以下の通りである。

28 プライマー1 5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3' (M13 primer)

29 プライマー2 3'-AACCAACCAACCCGCGATCGCTAGTCT-5'

Nhe I

30 プライマー3 5'-TGATTGGGCGCTAGCGATCA-3'

Nhe I

31 プライマー4 3'-TCCCAACCTTGTTCGAAATACAA-5'

Hind III

32 プライマー5 5'-TGAAACAAGCTTTTATGTTT-3'

Hind III

33 プライマー6 3'-CAGTATCGACAAAGGAC -5' (M13 RV primer)

PCR法の常法に従い、プライマー1とプライマー2
を用いて600bpの断片、プライマー3とプライマー
4を用いて360bp、プライマー5とプライマー6を
用いて340bpの断片を増幅後回収した。さらに、6
00bpの断片をEcoRIとNheIで消化、360
bpの断片をNheIとHindIIIで消化、340bp
の断片をHindIIIとPstIで消化後、それぞれ

2. 0%低融点アガロースゲル電気泳動に供しアガロースから回収した。各断片をクローニングするため、pUC19及びpUC18をDraIで開裂させた後、XhoIリンカーを挿入したプラスミドpUC19X、pUC18Xも取得した。各制限酵素で処理回収した600bpの断片及び360bpの断片と、pUC19XをEcoRIとHindIIIで開裂させて得られた断片とをリガーゼにより連結し、得られたプラスミドを抽出しこれをpUC19XL（約3.6kbp）と命名した。HindIIIとPstIで消化した340bp断片は、pUC18をHindIIIとPstIで開裂させて得られた断片とリガーゼにより連結し得られたプラスミドを抽出し、これをpUC18R（約3kbp）と命名した。pUC19XLをHindIIIとXhoIで消化した約2.5kbpの断片と、pUC18RをHindIIIとSpeIで消化した180bpの断片とpUC18Xを、XbaIとXhoIで消化した1.1kbpの断片を、それぞれアガロースゲル電気泳動に供した後回収し、これらをリガーゼで連結し、得られたプラスミドを抽出し、これをpTM67（約3.7kbp）を取得した。

(4) pNZ7929-67の構築（第9図（B））

実施例1(1)で得られたpUTTM1PをSpeIとKpnIで消化後アガロースゲル電気泳動に供し、3.9kbpの断片を回収した。同様にpTM67もSpeIとKpnIで消化後アガロース電気泳動に供し、

0.9 kbp の断片を回収、これを前記 3.9 kbp 断片とリガーゼにより連結し、得られたプラスミド、pUTM67 (4.8 kbp) を回収した。さらにこの pUTM67 を KpnI 消化後、HindIII で部分消化し、アガロースゲル電気泳動に供し、2.1 kbp の断片を回収し、この断片を pNZ1729R (参考例 2 参照) の HindIII と KpnI で開裂させて得られた 9.0 kbp の断片とリガーゼで連結し、プラスミド pNZ7929-67 (11.1 kbp) を取得した。

(5) 組み換えアビポックスウイルス

fNZ7929-67 の作製と純化

上記(4) で得た pNZ7929-67 を用い実施例 1 (3) と同様の操作を繰り返し、fNZ7929-67 を取得した。

実施例 7

TM-66 を有する組み換えアビポックスウイルス
fNZ7929-66 の取得

(1) TM-66 遺伝子をプローブにしたマイコプラズマ・ガリセプティカムのゲノミックサザンハイブリダイゼーション

参考例 1 (1) で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカム DNA 1 μ g を XbaI で消化し、0.6% 低融点アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルをアルカリ変性液 (0.5 M NaOH、1.5 M NaCl) に 10 分間浸し DNA を変性させ、中和液 (3 M 酢酸ナ

トリウム pH 5.5) に 10 分間浸して中和の後 6 倍 SSC 液 (0.7 M NaCl、0.07 M クエン酸ナトリウム、pH 7.5) 中でナイロンメンブレンに転写した。風乾の後 8.0 °C で 2 時間焼き付け、4 倍 SET (0.6 M NaCl、0.08 M Tris-HCl、4 mM EDTA、pH 7.8) - 10 倍 Denhardt - 0.1% SDS - 0.1% Na₄P₂O₇ - 50 µg/ml 変性サケ精子 DNA と pUM-1 (特開平 2-111795 号参照) を常法に従い標識したものを加えて、68 °C 14 時間ハイブリダイゼーションをした。ナイロンメンブレンと X 線フィルムを重ね、オートラジオグラフィーで確認したところ、約 6.3 kbp の断片にハイブリダイズしていることを確認した。

(2) XbaI 消化約 6.3 kbp 断片の pUC-19 へのクローニング及び配列分析

参考例 1 (1) で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカム DNA 4 µg を制限酵素 XbaI で消化後、0.6% 低融点アガロースゲル電気泳動後、上記実施例 7 (1) で確認した約 6.3 kbp の断片を回収した。この断片を、XbaI 消化によって開裂した pUC-19 とリガーゼによって連結し、コンピテントな大腸菌 TG1 株を形質転換し、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド 0.003%、イソプロピルチオ-β-D-ガラクトピラノシド 0.03

mM、 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含むLB寒天培地で 37°C 、15時間培養した。この培地上に生育した白コロニーをナイロンメンブレンに転写し、上記(1)と同様の方法でハイブリダイゼーションを行ない、オートラジオグラフィーで確認したところ、クローニングされていることが判明し、このプラスミドをpUM66 (約9 kbp) と名付けた。

pUM66内に挿入された約6.3 kbpの断片をSangerらのDideoxy法によって解析した。この断片に存在するORFの制限酵素地図を第10図に示し、このORFの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号16に示す。

このORFから推定されるポリペプチドをTM-66と名付けた。

(3) TM-66をコードするORFのTGAが翻訳終止コドンとして読まれないように改変(TGA→TGG)したpTM66の作製(第10図および第11図(A)～(C))

TM-66のORFのTGAコドンにTGGコドンに改変するにあたって、TM-67と同様ポリメラーゼチェーンリアクション法(PCR法: Science、230、1350 1354 (1985))を用いて変換した。変換用に合成したPCR法用PNAプライマーを配列番号34～43に示す。

PCR法を使用した配列番号34～43に相当するプ

ライマー 1 ~ 10 は以下の通りである。

ライマー--1 5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3' (M13 RV primer)

ライマー--2 3' -GTTCTTCCTGGCAAACCTTTA-5'

Ava II

ライマー--3 5' -AAGAAGGACCGTTTGGAAATG-3'

Ava II

ライマー--4 5' -GTTTTCCAGTCACGAC-3' (M13 primer)

ライマー--5 3' -CAAAGTACCTAAATATCGAATTCACCT-5'

Afl II

ライマー--6 5' -ATAGCTTAAGTGGAACAAACACG-3'

Afl II

ライマー--7 3' -GGAACCAGATCTTGTTTCCC-5'

Xba I

ライマー--8 5' -GGTCTAGAACAAAGGGATTGGACA-3'

Xba I

ライマー--9 3' -CTACCTACCATGGTGATGAT-5'

Kpn I

ライマー--10 5' -GATGGTACCCTACTATTTTCATGGACA-3'

Kpn I

p U M 6 6 を B g 1 II と S p e I で消化し、約 1 . 2 k b p の断片を 0 . 5 % 低融点アガロースから回収し、B a m H I と X b a I で開裂させた p U C 1 9 にリガー

ぜによって連結し、p U C T 2 (3 . 9 k b p) を取得した。次に p U C T 2 を鋳型とし、プライマー 1 とプライマー 2 を用い P C R 法の常法に従い約 6 2 0 b p の断片、プライマー 3 とプライマー 4 を用い約 5 5 0 b p の断片を増幅後、回収した。さらに、約 6 2 0 b p の断片を H i n d I I I と A v a I I で消化、5 5 0 b p の断片を A v a I I と B a m H I で消化し、これら断片と H i n d I I I と B a m H I で開裂させた p U C 1 9 とそれぞれリガーゼで連結し得られたプラスミドを抽出し、p U C 1 9 - 1 (3 . 9 k b p) と命名した。

次に p U C T 2 を鋳型にプライマー 4 とプライマー 6 を用い、P C R 法の常法に従い約 5 0 0 b p の断片、を増幅後回収し、また p U C T - 2 を鋳型にプライマー 1 とプライマー 5 を用い約 7 0 0 b p の断片を増幅後回収した。さらに約 5 0 0 b p の断片を A f I I I と E c o R I で、約 7 0 0 b p の断片を H i n d I I I と A f I I I で消化し、これらの断片を H i n d I I I と E c o R I で開裂させた p U C 1 9 とリガーゼで連結させ、得られたプラスミドを抽出し、p U C 1 9 - 2 (約 3 . 9 k b p) と命名した。さらに p U C 1 9 - 1 を E c o R I で消化し、消化物を 0 . 6 % 低融点アガロースゲルにかけ約 3 . 3 k b p の断片を回収した。p U C 1 9 - 2 についても E c o R I で消化し、2 . 0 % 低融点アガロースゲルから約 5 5 0 b p の断片を回収し、これを p U C 1 9 - 1 由来の上記約 3 . 3 k b p 断片とり

ガーゼにより連結し、TM-66のORFの5'側2ヶ所のTGAコドンが、TGGに変更された断片を含むプラスミドpUC19Lを取得した。

TM66のORFの3'側2ヶ所のTGAコドンをもTGGに偏向するため、まずpUM66をEcoRIとRvuIIで消化し約1720bpの断片を0.6%低融点アガロースゲールから回収し、pUC19をEcoRIとHincIIで開裂させたpUC19と連結させ、プラスミドpUCT3(約4.4Kbp)を取得した。pUCT3を鋳型にプライマー4とプライマー7を用い、PCR法の常法に従い約820bpの断片を、また、プライマー8とプライマー1を用い約900bpの断片をPCR法の常法に従いそれぞれ増幅後回収した。この820bpの断片を、EcoRIとXbaIで消化し、この消化物にXbaIをHindIIIで消化した上記約900bpの断片とHindIIIとEcoRIで開裂したpUC19とをリガーゼで連結させてプラスミドpUCT4(約4.4kbp)を取得した。次にpUCT-4を鋳型として、プライマー4とプライマー9を用いPCR法の常法に従い約880bpの断片を、pUCT3を鋳型としてプライマー1とプライマー10をPCR法の常法に従い約850bpの断片を増幅後それぞれ回収した。この880bpの断片をEcoRIとKpnIで消化し、HindIIIとKpnIで消化した上記850bpの断片と、EcoRIとHindIIIで開裂させたp

U C 1 9 とリガーゼによって連結させ、プラスミド p U C 1 9 R を取得した。

T M 6 6 の O R F の T G A コドンがすべて T G G に変更になったプラスミドを得るため、p U M 6 6 を M l u I と P v u I I で消化後、約 4 . 8 k b p の断片を 0 . 6 % 低融点アガロースゲルから回収し、この断片を p U C 1 9 R を M l u I と P s t I で消化した約 1 . 0 k b p の断片とリガーゼによって連結させ得られてプラスミドを回収した。さらに、このプラスミドを E c o T 2 2 I と N h e I で消化した約 5 . 2 k b p の断片と p U C 1 9 L を E c o T 2 2 I と N h e I で消化して得た約 6 4 0 b p の断片とをリガーゼにより連結し、T M - 6 6 の O R F 中の T G A コドンが、すべて T G G に変換された O R F 全長を含むプラスミドを取得しこれを p T M 6 6 (約 5 . 8 k b p) と命名した。

(4) p N Z 7 9 2 9 - 6 6 の作製 (第 1 2 図)

p T M 6 6 を P s t I で消化後、S s p I で部分消化し、約 2 . 4 k b p の断片を回収し、参考例の合成プロモーターの H i n d I I I 、H i n c I I 消化断片と、H i n d I I I と P s t I で開裂させた p U C 1 8 の三断片をリガーゼによって連結し、p U T M 6 6 P (約 5 . 2 k b p) を取得した。次に p U T M 6 6 P を H i n d I I I と B a m H I で消化して、その消化物を用いて低融点アガロースゲルより回収した断片 (約 2 . 5 k b p) を H i n d I I I と B a m H I で開裂させた

p N Z 1 7 2 9 R とリガーゼによって連結し、目的のプラスミド p N Z 7 9 2 9 - 6 6 (約 1 1 . 5 k b p) を取得した。

(5) f N Z 7 9 2 9 - 6 6 の作製と純化

上記(4) で得た p N Z 7 9 2 6 - 6 6 を用い実施例 1 (3) と同様に操作を繰り返し、f N Z 7 9 2 9 - 6 6 を取得した。

実施例 8

f N Z 7 9 2 9 - 6 7、f N Z 7 9 2 9 - 6 6 感染細胞における T M - 6 7、T M - 6 6 ポリペプチドの発現
f N Z 7 9 2 9 - 6 7、f N Z 7 9 2 9 X M 6 6 が T M 6 7、T M 6 6 ポリペプチドを感染細胞中で発現することをしらべるために免疫蛍光抗体法を行なった。
f N Z 7 9 2 9 - 6 7、f N Z 7 9 2 9 - 6 6 をそれぞれ、C E F に感染させ、3 7 °C でプラークが出現するまで培養後冷アセトンで固定し、マイコプラズマ・ガリセプティカム S 6 免疫鶏血清または、マイコプラズマ・ガリセプティカム感染鶏血清を一次抗体として、1 0 0 ~ 1 0 0 0 倍に希釈して反応させた。これらの培養細胞をさらに、蛍光物質 (F I T C) を結合した抗鶏イムノグロブリンと反応させ、非特異反応部分を洗い流したのち蛍光励起波長光下で顕微鏡観察した。反応性は表 3 に示した。

表 3

組み換えウイルス感染CEFの各種抗血清に対する反応性

一 次 抗 体			
感染ウイルス	抗S6	感染S6	SPF
fNZ7929-67	+++	+++	-
fNZ7929-66	+++	+++	-
fNZ2929XM1	++	++	-
NP	-	-	-

+++ : 全面に強く反応 ++ : 強く反応 + : 反応 - 反応しない

この結果から、本発明の組み換えウイルスである
fNZ7929-66、fNZ7929-66、及
びfNZ2929XM1が感染した細胞のみに反応する
抗S6、S6感染と反応することが判った。

実施例 9

組み換えFPV接種鶏の誘導抗体の生育阻止活性

fNZ7929-67及びfNZ7929-66をそれぞれCEFで37℃、48時間培養後、二回凍結融解を繰り返し、細胞浮遊液を回収し、ウイルスタイターが 10^6 pfu/mlとなるように調製したのち生後7日のSPF鶏（Line M、日本生物科学研究所）の右翼膜

に穿刺用針で $10 \mu\text{l}$ 接種した。接種後全鶏発痘を観察し、接種から2週後に血清を採取した。

一方、マイコプラズマ・ガリセプティカム S 6 株を P P L O 液体培地（変法 C h a n o c k の培地）に 1.0% 植菌し 37°C で3日間培養したあと、 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターを通して凝集菌体を取り除いたろ液を、菌体数が 10^3 CFU/ml になるように P P L O 液体培地で希釈し、活性測定用菌液とした。

この菌液を滅菌したポリプロピレン製のチューブに $400 \mu\text{l}$ 分注し、標準鶏血清、TMG-1 免疫血清（特開平 2-111795 号）、各種血清をそれぞれ $100 \mu\text{l}$ 加えて、 37°C で2～5日間培養することにより生育阻止試験を行なった。

培養 0、1、2、3、4 日目に各マイコプラズマ・ガリセプティカム（以下 MG と称す）生育阻止試験培養液から各 $10 \mu\text{l}$ を採取し、P P L O 寒天培地に広げ 37°C で7日間培養し、出現したコロニー数で対応する培養液中の菌数を演えきした。その3日目の菌数測定の結果を表 4 に示す。

表 4

試 料	3日目の菌数
S P F 鶏血清	1. 3×10^6
抗 T T M G - 1 鶏血清	1. 8×10^5
f N Z 2 9 2 9 X M I 接種鶏血清	4. 5×10^5
f N Z 7 9 2 9 - 6 7 接種鶏血清	2. 8×10^4
f N Z 7 9 2 9 - 6 6 接種鶏血清	3. 2×10^4

添加した試料が S P F 鶏血清または馬血清を加えた培地の培養液では、M G の増殖速度に差はなく、培養 3 日目で菌数は飽和に達した。f N Z 7 9 2 9 - 6 7、f N Z 7 9 2 9 - 6 6 接種血清を添加した培養液では f N Z 2 9 2 9 X M I はもちろん抗 T T M G - 1 鶏血清のように M G の生育を阻害する抗体を誘導する抗原を免疫した場合以上に効果的に M G の増殖を抑制している。このことから、T M 6 7 ポリペプチド、T M 6 6 ポリペプチドは、T T M G - 1 以上に M G の生育を抑制できる抗体を誘導できる抗原であることを示している。

実施例 10

マイコプラズマ・ガリセプティカムが発現しているポリペプチド D N A T M - 1 6 の取得

(1) マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノム D

N A の調製

マイコプラズマ・ガリセプティカム S 6 株を 1 0 0 m l の P P L O ブロス基礎培地に 2 0 % 馬血清、5 % 酵母エキス、1 % グルコース、および p H 指示薬としてフェノールレッドを微量加えて調製した液体培地で、3 7 ° C 3 ~ 5 日培養した。マイコプラズマ・ガリセプティカムの増殖に従って培養液の p H が下がり、培養液に含まれている p H 指示薬の呈色が赤から黄に変化した時点で、培養を終了し、培養液を 8 0 0 0 G、2 0 分間遠心し、集菌した。さらに菌体を培養液の 1 / 1 0 容量の P B S に懸濁し、再び 1 0 , 0 0 r p m、2 0 分間遠心し、集菌した。収集菌体を再び 2 . 7 m l の P B S に懸濁し、1 % になる用に S D S を、さらに 1 0 μ g の R N a s e を加え、3 7 ° C 3 0 分間インキュベートし溶菌した。

溶菌液を等容量のフェノールで 3 回抽出しさらに、エチルエーテルで 3 回抽出を行なった後エタノール沈殿し、マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノム D N A 2 0 0 μ g を得た。

(2) M - 1 6 D N A をプローブにしたマイコプラズマ・ガリセプティカムのゲノミックサザンハイブリダイゼーション

上記 (1) で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカム D N A 1 μ g を X b a I で消化し、0 . 6 % 低融点アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルをアルカリ変性液 (0 . 5 M N a O H、1 . 5 M N a C l)

に 10 分間浸し DNA を変性させ、中和液（3 M 酢酸ナトリウム pH 5.5）に 10 分間浸して中和の後 6 倍 SSC 液（0.7 M NaCl、0.07 M クエン酸ナトリウム、pH 7.5）中でナイロンメンブレンに転写した。風乾の後 80℃で 2 時間焼き付け、4 倍 SET（0.6 M NaCl、0.08 M Tris-HCl、4 mM EDTA、pH 7.8）- 10 倍 Denhardt - 0.1% SDS - 0.1% Na₄P₂O₇ - 50 μg/ml 変性サケ精子 DNA と pUM-16（このプラスミド内に M-16 遺伝子が含まれている；特開平 2-111795 号参照）を常法に従い標識したものを加えて、68℃14 時間ハイブリダイゼーションをした。ナイロンメンブレンと X 線フィルムを重ね、オートラジオグラフィーで確認したところ、約 5.5 kbp の断片にハイブリダイズしていることを確認した。

（3） XbaI 消化約 5.5 kbp 断片の pUC-19 へのクローニング及びコロニーハイブリダイゼーション

上記（1）で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカム DNA 4 μg を制限酵素 XbaI で消化後、0.6% 低融点アガロースゲル電気泳動後、約 5.5 kbp の断片を回収した。この断片を、XbaI 消化によって開裂した pUC-19 とリガーゼによって連結し、コンピテントな大腸菌 TG1 株を形質転換し、5-ブロモ-4

ークロロー 3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド 0.003%、イソプロピルチオ- β -D-ガラクトピラノシド 0.03 mM、40 μ g/ml アンピシリンを含む LB 寒天培地で 37°C、15 時間培養した。この培地上に生育した白コロニーをナイロンメンブレンに転写し、上記(2)と同様の方法でハイブリダイゼーションを行ない、オートラジオグラフィーで確認したところ、クローニングされていることが判明し、このプラスミドを pUM16 と名付けた。

(4) pUM-16 インサート DNA の配列分析

上記(3)で作製した pUM-16 内に挿入された約 5.5 kbp の断片の配列を Sanger らの Dideoxy 法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、74、5463 (1977)) によって解析した。

この断片の制限酵素切断点地図を第 13 図に示す。また、この断片中に存在するオープンリーディングフレームの制限酵素切断点地図を第 14 図に示し、この ORF の塩基配列及びそれから推定されるアミノ酸配列を配列番号 15 に示す。この ORF から推定されるポリペプチドを TM-16 ポリペプチドと命名した。

尚、以下にこの発明に使用する配列を配列リスティングとして記述するが、原則としてプライマーに使用した配列は 3' 側から表記した。ただし、明細書本文中で 5' 側から表記したプライマーは、そのまま 5' 側より表記

している。

配列リスティング

(1) 一般情報

(i) 出願人：米国

中野克彦

斉藤修治

大川節子

塩野芳彦

入谷好一

青山茂美

高橋清人

佐伯早木子

大澤郁郎

船戸洋乃

米国以外の指定国

日本ゼオン株式会社

塩野義製薬株式会社

(ii) 発明の名称：新規なポリペプチド、同ポリペプチドをコードするDNA、同DNAを含む組み換えベクター、同組み換えベクターを利用した組み換えウイルス、およびその利用

(iii) 配列の数：43

(2) 配列番号1についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ : 2369
 (B) 配列の型 : アミノ酸
 (C) 鎖の数 : 二本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状
 (E) 配列の種類 : DNA

(xi) 配列の表示 : 配列番号 1

```

GTCTGGGGTT GGTTCGATCA GCGAAAATAA ACCCGATTTA TTACTTACTG AACTTTATAT      60
ATTCTTTAGA TAATAATAGA CGTGGTGAAC GTAAGTTATT GGCTTAACCT TAAGTGA AAA      120
GAAAAACAT TTTAAAGTIT GTTAGTTTAT TAGGTATIGT TTCGTTTGTA ATG TTA      176
                                         Met Leu

GCA GCT GCT AGT TGT ACT TCA GCA GCT ACA CCA ACT CCA AAC CCT GAA      224
Ala Ala Ala Ser Cys Thr Ser Ala Ala Thr Pro Thr Pro Asn Pro Glu
      5              10              15

CCA AAA CCA ACT CCA AAC CCT GAA CCA AAA CCA GAT CCA ATG CCA AAC      272
Pro Lys Pro Thr Pro Asn Pro Glu Pro Lys Pro Asp Pro Met Pro Asn
      20              25              30

CCT CCT AGT GGT GGT AAC ATG AAT GGT GGA AAC ACC AAC CCA AGT GAT      320
Pro Pro Ser Gly Gly Asn Met Asn Gly Gly Asn Thr Asn Pro Ser Asp
      35              40              45              50

GGG CAA GGC ATG ATG AAT GCA GCT GCT AAA GAA TTA GCA GAC GCA AAA      368
Gly Gln Gly Met Met Asn Ala Ala Ala Lys Glu Leu Ala Asp Ala Lys
              55              60              65

GCT GCT TTA ACT ACT TTG ATT AAT GGT GAA ACT GCA AAT CTT GCG TCA      416
Ala Ala Leu Thr Thr Leu Ile Asn Gly Glu Thr Ala Asn Leu Ala Ser
              70              75              80

TAT GAA GAC TAT GCT AAG ATC AAA AGT GAA TTA ACA TCA GCG TAT GAA      461
Tyr Glu Asp Tyr Ala Lys Ile Lys Ser Glu Leu Thr Ser Ala Tyr Glu
              85              90              95

ACA GCT AAA GCA GTT TCA GCT AAA ACT GGT GCA ACT CTA AAT GAG GTT      512
Thr Ala Lys Ala Val Ser Ala Lys Thr Gly Ala Thr Leu Asn Glu Val
      100              105              110

```


(2) 配列番号 3 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ : 48

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 1 本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(E) 配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示 : 配列番号 3

GATCTTCCAT TTTAGGATCT ATATTATTTT TTCAACGATC CGAGCTCG

48

(2) 配列番号 4 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ : 55

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 1 本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(E) 配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示 : 配列番号 4

AGCTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTGGCATAT AAATAATAAA TACAATAATT AATTA 55

(2) 配列番号 5 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ : 55

(B) 配列の型 : 核酸

- (C) 鎖の数 : 1 本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (E) 配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA
- (xi) 配列の表示 : 配列番号 5

CGCGTAATTA ATTATTGTAT TTATTATTTA TATGCCAAAA AAAAAAAAAA AAAAA 55

(2) 配列番号 6 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ : 40
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1 本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (E) 配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA
- (xi) 配列の表示 : 配列番号 6

CGCGTAAAAA TTGAAAAACT ATTCTAATTT ATTGCACTCG 40

(2) 配列番号 7 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ : 40
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1 本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (E) 配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA
- (xi) 配列の表示 : 配列番号 7

GATCCGAGTG CAATAAATTA GAATAGTTTT TCAATTTTTA 40

(2) 配列番号 8 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 42

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 1 本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 8

GATCCCCGGG CGAGCTCGCT AGCGGGCCCG CATGCGGTAC CG 42

(2) 配列番号 9 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 42

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 1 本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 9

TCGACGGATC CGCATGCGGG CCCGCTAGCG AGCTCGCCCG GG 42

(2) 配列番号 10 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 39

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 1 本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 1 0

TCGACCCGGT ACATTTTAT AAAAATGTAC CCGGGGATC

39

(2) 配列番号 1 1 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 35

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 1 本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 1 1

GATCCCCGGG TACATTTTAT TAAAAATGTA CCGGG

35

(2) 配列番号 1 2 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 14

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 1 本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 1 2

ATTTTATATAA AAAT

14

(2) 配列番号 1 3 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ : 66

(B) 配列の型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(E) 配列の種類 : DNA

(xi) 配列の表示 : 配列番号 1 3

ATC GCG ATC CTA CTT TTA ACA GTA GTG ACC TTA GCC ATC TCT GCA GCC 48

Ile Ala Ile Leu Leu Leu Thr Val Val Thr Leu Ala Ile Ser Ala Ala

5

10

15

GCC CTT GCA TAT AGT ATG

66

Ala Leu Ala Tyr Ser Met

20

(2) 配列番号 1 4 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ : 1387

(B) 配列の型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(E) 配列の種類 : DNA

(xi) 配列の表示 : 配列番号 1 4

AAAAACATCA GATTGTTAAT CTGATATCTT TGCTTAAAAA AACACAAAAT CTTCTAACAA	60
AATCCTAAAT AAATAAGCCG TTAAATTAAAC TAAAAAATTA AAAAAATGGT TTTTCTTATC	120
AACCAAAATT CTCTAGTAAT AAACGCCTAT TTATTTTTAT TTTTAGTCAT CTTTAAAGAT	180
ATAAATATAT CTTAATATTC T ATG AAT AAG AAA AGA ATC ATC TTA AAG ACT	231
Met Asn Lys Lys Arg Ile Ile Leu Lys Thr	
5 10	
ATT AGT TTG TTA GGT ACA ACA TCC TTT CTT AGC ATT GGG ATT TCT AGC	279
Ile Ser Leu Leu Gly Thr Thr Ser Phe Leu Ser Ile Gly Ile Ser Ser	
15 20 25	
TGT ATG TCT ATT ACT AAA AAA GAC GCA AAC CCA AAT AAT GGC CAA ACC	375
Cys Met Ser Ile Thr Lys Lys Asp Ala Asn Pro Asn Asn Gly Gln Thr	
30 35 40	
CAA TTA CAA GCA GCG CGA ATG GAG TTA ACT GAT CTA ATC AAT GCT AAA	327
Gln Leu Gln Ala Ala Arg Met Glu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Ala Lys	
45 50 55	
GCA AGG ACA TTA GCT TCA CTA CAA GAC TAT GCT AAG ATT GAA GCT AGT	423
Ala Arg Thr Leu Ala Ser Leu Gln Asp Tyr Ala Lys Ile Glu Ala Ser	
60 65 70	
TTA TCA TCT GCT TAT AGT GAA GCT GAA ACA GTT AAC AAT AAC CTT AAT	471
Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Glu Ala Glu Thr Val Asn Asn Asn Leu Asn	
75 80 85 90	
GCA ACA CTA GAA CAA CTA AAA ATG GCT AAA ACT AAT TTA GAA TCA GCC	519
Ala Thr Leu Glu Gln Leu Lys Met Ala Lys Thr Asn Leu Glu Ser Ala	
95 100 105	
ATC AAC CAA GCT AAT ACG GAT AAA ACG ACT TTT GAT AAT GAA CAT CCA	567
Ile Asn Gln Ala Asn Thr Asp Lys Thr Thr Phe Asp Asn Glu His Pro	
110 115 120	

AAT TTA GTT GAA GCA TAC AAA GCA CTA AAA ACC ACT TTA GAA CAA CGT	615
Asn Leu Val Glu Ala Tyr Lys Ala Leu Lys Thr Thr Leu Glu Gln Arg	
125 130 135	
GCT ACT AAC CTT GAA GGT TTA GCT TCA ACT GCT TAT AAT CAG ATT CGT	663
Ala Thr Asn Leu Glu Gly Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Ile Arg	
140 145 150	
AAT AAT TTA GTG GAT CTA TAC AAT AAT GCT AGT AGT TTA ATA ACT AAA	711
Asn Asn Leu Val Asp Leu Tyr Asn Asn Ala Ser Ser Leu Ile Thr Lys	
155 160 165 170	
ACA CTA GAT CCA CTA AAT GGG GGA ATG CTT TTA GAT TCT AAT GAG ATT	759
Thr Leu Asp Pro Leu Asn Gly Gly Met Leu Leu Asp Ser Asn Glu Ile	
175 180 185	
ACT ACA GTT AAT CGG AAT ATT AAT AAT ACG TTA TCA ACT ATT AAT GAA	807
Thr Thr Val Asn Arg Asn Ile Asn Asn Thr Leu Ser Thr Ile Asn Glu	
190 195 200	
CAA AAG ACT AAT GCT GAT GCA TTA TCT AAT AGT TTT ATT AAA AAA GTG	855
Gln Lys Thr Asn Ala Asp Ala Leu Ser Asn Ser Phe Ile Lys Lys Val	
205 210 215	
ATT CAA AAT AAT GAA CAA AGT TTT GTA GGG ACT TTT ACA AAC GCT AAT	903
Ile Gln Asn Asn Glu Gln Ser Phe Val Gly Thr Phe Thr Asn Ala Asn	
220 225 230	
GTT CAA CCT TCA AAC TAC AGT TTT GTT GCT TTT AGT GCT GAT GTA ACA	951
Val Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Phe Val Ala Phe Ser Ala Asp Val Thr	
235 240 245 250	
CCC GTC AAT TAT AAA TAT GCA AGA AGG ACC GTT NNN AAT GGT GAT GAA	999
Pro Val Asn Tyr Lys Tyr Ala Arg Arg Thr Val Xaa Asn Gly Asp Glu	
255 260 265	

AAT TTA GTT GAA GCA TAC AAA GCA CTA AAA ACC ACT TTA GAA CAA CGT	615
Asn Leu Val Glu Ala Tyr Lys Ala Leu Lys Thr Thr Leu Glu Gln Arg	
125 130 135	
GCT ACT AAC CTT GAA GGT TTA GCT TCA ACT GCT TAT AAT CAG ATT CGT	663
Ala Thr Asn Leu Glu Gly Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Ile Arg	
140 145 150	
AAT AAT TTA GTG GAT CTA TAC AAT AAT GCT AGT AGT TTA ATA ACT AAA	711
Asn Asn Leu Val Asp Leu Tyr Asn Asn Ala Ser Ser Leu Ile Thr Lys	
155 160 165 170	
ACA CTA GAT CCA CTA AAT GGG GGA ATG CTT TTA GAT TCT AAT GAG ATT	759
Thr Leu Asp Pro Leu Asn Gly Gly Met Leu Leu Asp Ser Asn Glu Ile	
175 180 185	
ACT ACA GTT AAT CGG AAT ATT AAT AAT ACG TTA TCA ACT ATT AAT GAA	807
Thr Thr Val Asn Arg Asn Ile Asn Asn Thr Leu Ser Thr Ile Asn Glu	
190 195 200	
CAA AAG ACT AAT GCT GAT GCA TTA TCT AAT AGT TTT ATT AAA AAA GTG	855
Gln Lys Thr Asn Ala Asp Ala Leu Ser Asn Ser Phe Ile Lys Lys Val	
205 210 215	
ATT CAA AAT AAT GAA CAA AGT TTT GTA GGG ACT TTT ACA AAC GCT AAT	903
Ile Gln Asn Asn Glu Gln Ser Phe Val Gly Thr Phe Thr Asn Ala Asn	
220 225 230	
GTT CAA CCT TCA AAC TAC AGT TTT GTT GCT TTT AGT GCT GAT GTA ACA	951
Val Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Phe Val Ala Phe Ser Ala Asp Val Thr	
235 240 245 250	
CCC GTC AAT TAT AAA TAT GCA AGA AGG ACC GTT NNN AAT GGT GAT GAA	999
Pro Val Asn Tyr Lys Tyr Ala Arg Arg Thr Val Xaa Asn Gly Asp Glu	
255 260 265	

CCT TCA AGT AGA ATT CTT GCA AAC ACG AAT AGT ATC ACA GAT GTT TCT	1047
Pro Ser Ser Arg Ile Leu Ala Asn Thr Asn Ser Ile Thr Asp Val Ser	
270 275 280	
Xaa ATT TAT AGT TTA GCT GGA ACA AAC ACG AAG TAC CAA TTT AGT TTT	1095
NNN Ile Tyr Ser Leu Ala Gly Thr Asn Thr Lys Tyr Gln Phe Ser Phe	
285 290 295	
AGC AAC TAT GGT CCA TCA ACT GGT TAT TTA TAT TTC CCT TAT AAG TTG	1143
Ser Asn Tyr Gly Pro Ser Thr Gly Tyr Leu Tyr Phe Pro Tyr Lys Leu	
300 305 310	
GTT AAA GCA GCT GAT GCT AAT AAC GTT GGA TTA CAA TAC AAA TTA AAT	1191
Val Lys Ala Ala Asp Ala Asn Asn Val Gly Leu Gln Tyr Lys Leu Asn	
315 320 325 330	
AAT GGA AAT GTT CAA CAA GTT GAG TTT GCC ACT TCA ACT AGT GCA AAT	1239
Asn Gly Asn Val Gln Gln Val Glu Phe Ala Thr Ser Thr Ser Ala Asn	
335 340 345	
AAT ACT ACA GCT AAT CCA ACT CAG CAG TTG ATG AGA TTA AAG TTG CTA	1287
Asn Thr Thr Ala Asn Pro Thr Gln Gln Leu Met Arg Leu Lys Leu Leu	
350 355 360	
AAA TCG TTT TAT CAG GTT TAA GATTGGCCA AAACACAATC GAATTAAGTC	1338
Lys Ser Phe Tyr Gln Val ***	
365	
TTCCAACGGG TGAAGGAAAT ATGAATAAAG TTGCGCCAAT GATTGGCAA	1387

(2) 配列番号 1 5 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ : 1945

(B) 配列の型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(E) 配列の種類 : DNA

(xi) 配列の表示 : 配列番号 1 5

CGTACGTTTT AATGGCTATT GGGCTCTTAT TTTATTGTCA GGATTGCAC TAACAGCAGTT	60
ATAGCAAGC CCAATTAAGT CAGTAGAAGT TACAGAG ATG ATG AAT GGT CAA GAA	114
Met Met Asn Gly Gln Glu	
	5
GTC ACA ACA ACT AAA AAG ATT AGT ACG TTT GCC TTC TTA ATC AAC ATG	162
Val Thr Thr Thr Lys Lys Ile Ser Thr Phe Ala Phe Leu Ile Asn Met	
1 0 1 5 2 0	
TTA CCA AAT TAC CAA CTA AGT ACA CTT GGT TAC TTA CAG ATT ACA GCA	210
Leu Pro Asn Tyr Gln Leu Ser Thr Leu Gly Tyr Leu Gln Ile Thr Ala	
2 5 3 0 3 5	
GCT GCT GCT GGA CTT GTA GTA GGG ATT GTA TTA CTT GCA TTA GGC GCA	258
Ala Ala Ala Gly Leu Val Val Gly Ile Val Leu Leu Ala Leu Gly Ala	
4 0 4 5 5 0	
ACA TTC TTT GTT AAA ACT AGA CGT AAA ACA AAT GAA ATG CTT GCT GCA	306
Thr Phe Phe Val Lys Thr Arg Arg Lys Thr Asn Glu Met Leu Ala Ala	
5 5 6 0 6 5 7 0	
CTT CAA GAT GCT GAA GAA GAA GAA GTG GCA CAA GAA GAA CAA GCT GAA	354
Leu Gln Asp Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Gln Glu Glu Gln Ala Glu	
7 5 8 0 8 5	
GAA AAT GTT GAA GTC ACT CCA ACT CAA CAA GCT GAA GTT AAG ACT GAA	402
Glu Asn Val Glu Val Thr Pro Thr Gln Gln Ala Glu Val Lys Thr Glu	
9 0 9 5 1 0 0	
CAA TTA ATT GGC ACA CAA TTA GTA ACA ACT GAT GTA GCT AGC AAT CAA	450
Gln Leu Ile Gly Thr Gln Leu Val Thr Thr Asp Val Ala Ser Asn Gln	
1 0 5 1 1 0 1 1 5	
GCT GCA GGT ACT GAA CAA GTT GAA GGT GAT TTA TTA CCT CCT AGT CAA	498
Ala Ala Gly Thr Glu Gln Val Glu Gly Asp Leu Leu Pro Pro Ser Gln	
1 2 0 1 2 5 1 3 0	

CAA CCA ACG GAA ATG CGT CCA GCT CCT TCA CCA ATG GGT AGT CCT AAG	546
Gln Pro Thr Glu Met Arg Pro Ala Pro Ser Pro Met Gly Ser Pro Lys	
135 140 145 150	
TTA TTA GGT CCA AAC CAA GCT GGT CAT CCA CAA CAC GGA CCA CGT CCC	594
Leu Leu Gly Pro Asn Gln Ala Gly His Pro Gln His Gly Pro Arg Pro	
155 160 165	
ATG AAT GCT CAT CCA GGT CAA CCA CGT CCT CAA CAA GCT GGC CCA CGT	642
Met Asn Ala His Pro Gly Gln Pro Arg Pro Gln Gln Ala Gly Pro Arg	
170 175 180	
CCA ATG GGA GCT GGT GGA TCT AAC CAA CCA AGA CCC ATG CCA AAT GGT	690
Pro Met Gly Ala Gly Gly Ser Asn Gln Pro Arg Pro Met Pro Asn Gly	
185 190 195	
CCA CAA AAC CAA CAA GGT CCA AGA CCA ATG AAC CCT CAA GGC AAT CCT	738
Pro Gln Asn Gln Gln Gly Pro Arg Pro Met Asn Pro Gln Gly Asn Pro	
200 205 210	
CGT CCT GGA CCA GCT GGC CCA CGA CCT AAC GGC CCA CAA AAT TCT CAA	786
Arg Pro Gly Pro Ala Gly Pro Arg Pro Asn Gly Pro Gln Asn Ser Gln	
215 220 225 230	
CCA CGT CCT CAA CCA GCT GGC CCA CGT CCA ATG GGA GCT GGT AGA TCT	834
Pro Arg Pro Gln Pro Ala Gly Pro Arg Pro Met Gly Ala Gly Arg Ser	
235 240 245	
AAC CAA CCA AGA CCA ATG CCA AAT GGT CCA CAA AAC CAA CAA GGT CCA	882
Asn Gln Pro Arg Pro Met Pro Asn Gly Pro Gln Asn Gln Gln Gly Pro	
250 255 260	
AGA CCA ATG AAC CCT CAA GGC AAT CCT CGT CCT CAA CCA GCT GGT GTC	930
Arg Pro Met Asn Pro Gln Gly Asn Pro Arg Pro Gln Pro Ala Gly Val	
265 270 275	
AGA CCT AAC AGC CCA CAA GCT AAC CAG CCA GGA CCA CGT CCA ACG CCA	978
Arg Pro Asn Ser Pro Gln Ala Asn Gln Pro Gly Pro Arg Pro Thr Pro	
280 285 290	

AAT AAT CCT CAA GGA CCA CGG CCA ATG GGT CCA AGA CCA AAT GGA GGA	1026
Asn Asn Pro Gln Gly Pro Arg Pro Met Gly Pro Arg Pro Asn Gly Gly	
295 300 305 310	
CCA AAC CGA GCT TAATTAACCA ATAGATTAGC TCTAAATTTG AAAACAGTTC	1078
Pro Asn Arg Ala	
ATTTCTAGTA AAATGAACTG TTTTTTTTAT TATTTGTAAG TAAATTTATT AATCAACCGC	1138
TTGTTTTGTT GAATAAAGAT AGATCACAAC ATCTTCTTGA TTTACATCTT TAATTTGCAT	1198
ATTATTGATC ATTAAAGGGA TCTTGATGAT CTGATACATC TTGTTATTCT CATAATCAAG	1258
ATAATTAAGA TGTGAAGCAC TAAAAGCAAA TAGCTCTTGT TCAGATTGGA TTAGTCTTTT	1318
AGCATTATTT AAGAAGACT GATCATCACT CAGTAATAAT AAGATCTGAT TCAAGTTTTT	1378
GATATCAGTT GCTACTTCTT GATTTAACAT CAATGTTTCA TAGCGTGATA ATAAGGATTT	1438
AAAACGGTGA ATGATTGATG TCGTTGCACT TTTCTCATCG TTGGTTTCAA CGTATTGAAA	1498
AGTGTTCAAT AAGTTAATGT ATTCTTGCTG GTATTTCTTA TTAATCTGAT CAGGGTTATC	1558
TGAATAGATT AAGATGTTCT TATTAGTTTG ATCAACAATA ACCATCGTTG CTTTCATTAA	1618
AGCTCAGTAA GTAAATAGTT TTTCAATCTT ATGCTTTAAT AAAAACGGGA TGATATTCTT	1678
ATGTAGGTTA AACTTATTAA AAATAAGTTT TGCAATCTGG TTGACTAGTT TATGATCAAC	1738
CTGGTTGATA GTTAATTTCT TAAGCATAAG AAGATTTTAA AATATTTAAA AAAACTATTG	1798
CTGATATGTT AAAATAGTTA AGGTATAAAA ATAATAAATT AAATATGGCT CGTAGAGATG	1858
ATCTAACGGG GCTTGGTCTT TTAGCAGGAA ATAATCGTTC TCATGCTTTA AACATTACCA	1918
AGCGTCGTTG AAACTTAAAC CTACAAA	1945

(2) 配列番号 16 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ : 1935

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(E) 配列の種類: DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 1 6

TTTATTTTTA TTTTGGTAA ATCTTTTAAA ATATAAATAT ATTTTAATAT TCT ATG	56
Met	
AAT AAA AAA AGA ATC ATC TTA AAG ACT ATT AGC TTG TTA GGT ACA ACA	104
Asn Lys Lys Arg Ile Ile Leu Lys Thr Ile Ser Leu Leu Gly Thr Thr	
5 10 15	
TCC TTT CTT AGT ATT GGG ATT TCT AGC TGT ATG TCT ATT ACT AAA AAA	152
Ser Phe Leu Ser Ile Gly Ile Ser Ser Cys Met Ser Ile Thr Lys Lys	
20 25 30	
GAT GCA AAC CCA AAT AAT GGC CAA ACC CAA TTA GAA GCA GCG CGA ATG	200
Asp Ala Asn Pro Asn Asn Gly Gln Thr Gln Leu Glu Ala Ala Arg Met	
35 40 45	
GAG TTA ACA GAT CTA ATC AAT GCT AAA GCG ATG ACA TTA GCT TCA CTA	248
Glu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Ala Lys Ala Met Thr Leu Ala Ser Leu	
50 55 60 65	
CAA GAC TAT GCC AAG ATT GAA GCT AGT TTA TCA TCT GCT TAT AGT GAA	296
Gln Asp Tyr Ala Lys Ile Glu Ala Ser Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Glu	
70 75 80	
GCT GAA ACA GTT AAC AAT AAC CTT AAT GCA ACA TTA GAA CAA CTA AAA	344
Ala Glu Thr Val Asn Asn Asn Leu Asn Ala Thr Leu Glu Gln Leu Lys	
85 90 95	
ATG GCT AAA ACT AAT TTA GAA TCA GCC ATC AAC CAA GCT AAT ACG GAT	392
Met Ala Lys Thr Asn Leu Glu Ser Ala Ile Asn Gln Ala Asn Thr Asp	
100 105 110	
AAA ACG ACT TTT GAT AAT GAA CAC CCA AAT TTA GTT GAA GCA TAC AAA	440
Lys Thr Thr Phe Asp Asn Glu His Pro Asn Leu Val Glu Ala Tyr Lys	
115 120 125	
GCA CTA AAA ACC ACT TTA GAA CAA CGT GCT ACT AAC CTT GAA GGT TTG	488

Ala	Leu	Lys	Thr	Thr	Leu	Glu	Gln	Arg	Ala	Thr	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	
130					135					140					145	
TCA	TCA	ACT	GCT	TAT	AAT	CAA	ATT	CGC	AAT	AAT	TTA	GTG	GAT	CTA	TAC	536
Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Asn	Gln	Ile	Arg	Asn	Asn	Leu	Val	Asp	Leu	Tyr	
			.150						155					160		
AAT	AAA	GCT	AGT	AGT	TTA	ATA	ACT	AAA	ACA	CTA	GAT	CCA	CTA	AAT	GGG	584
Asn	Lys	Ala	Ser	Ser	Leu	Ile	Thr	Lys	Thr	Leu	Asp	Pro	Leu	Asn	Gly	
			165					170					175			
GGA	ACG	CIT	TTA	GAT	TCT	AAT	GAG	ATT	ACT	ACA	GCT	AAT	AAG	AAT	ATT	632
Gly	Thr	Leu	Leu	Asp	Ser	Asn	Glu	Ile	Thr	Thr	Ala	Asn	Lys	Asn	Ile	
			180					185					190			
AAT	AAT	ACG	TTA	TCA	ACT	ATT	AAT	GAA	CAA	AAG	ACT	AAT	GCT	GAT	GCA	680
Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Thr	Ile	Asn	Glu	Gln	Lys	Thr	Asn	Ala	Asp	Ala	
			195				200						205			
TTA	GCT	AAT	AGT	TTT	ATT	AAA	GAA	GTG	ATT	CAA	AAT	AAT	AAA	CAA	AGT	728
Leu	Ala	Asn	Ser	Phe	Ile	Lys	Glu	Val	Ile	Gln	Asn	Asn	Lys	Gln	Ser	
210					215					220				225		
TTT	GTA	GGA	ATG	TTT	ACA	AAC	ACT	AAT	GTT	CAA	CCT	TCA	AAC	TAT	AGT	776
Phe	Val	Gly	Met	Phe	Thr	Asn	Thr	Asn	Val	Gln	Pro	Ser	Asn	Tyr	Ser	
					230					235				240		
TTT	GTT	GCT	TTT	AGT	GCT	GAT	GTA	ACA	CCT	GTT	AAT	TAT	AAA	TAT	GCA	824
Phe	Val	Ala	Phe	Ser	Ala	Asp	Val	Thr	Pro	Val	Asn	Tyr	Lys	Tyr	Ala	
			245					250						255		
AGA	AGA	ACG	GTT	TGA	AAT	GGT	GAT	GAA	CCT	TCA	AGT	AGA	ATT	CIT	GCA	872
Arg	Arg	Thr	Val	Trp	Asn	Gly	Asp	Glu	Pro	Ser	Ser	Arg	Ile	Leu	Ala	
			260					265						270		
AAC	ACC	AAT	AGT	ATT	ACT	GAT	GTT	TCA	TGA	ATT	TAT	AGT	TTA	TCT	GGA	920
Asn	Thr	Asn	Ser	Ile	Thr	Asp	Val	Ser	Trp	Ile	Tyr	Ser	Leu	Ser	Gly	
			275					280								
ACA	AAC	ACG	AAA	TAC	CAA	TTT	AGT	TTT	AGC	AAC	TAC	GGT	CCA	TCA	ACT	968

Phe Thr Gly Leu Thr Asp Asn Gly Val Gln Thr Ser Asp Pro Val Tyr			
450	455	460	465
TTA ATT GGT TTG ATT GGT GGT CGT CAG GAT CGT ACA GTT GCA ACT GGT	1496		
Leu Ile Gly Leu Ile Gly Gly Arg Gln Asp Arg Thr Val Ala Thr Gly			
470	475	480	
ACA ACG AAT ATT CAA AAT TCT CCT GAT GTA GAT AAT GAT AAT AGA ACA	1544		
Thr Thr Asn Ile Gln Asn Ser Pro Asp Val Asp Asn Asp Asn Arg Thr			
485	490	495	
TTC ACA ATA TAT GTA AAT GCA CCA ATA AAC GGG AAC TAT CAC ATA AGT	1592		
Phe Thr Ile Tyr Val Asn Ala Pro Ile Asn Gly Asn Tyr His Ile Ser			
500	505	510	
GGT GCG TAT TTA CAA GGA ACG CGT ACA GCA AGA AGT CTG AAA TTC TCA	1640		
Gly Ala Tyr Leu Gln Gly Thr Arg Thr Ala Arg Ser Leu Lys Phe Ser			
515	520	525	
TCC GGT ACA AGT GGC AGT AAT AAT GAA GTT ACA GTC CTT GGT TTA GAA	1688		
Ser Gly Thr Ser Gly Ser Asn Asn Glu Val Thr Val Leu Gly Leu Glu			
530	535	540	545
CAA AGG GAT TGA ACA ATA TTA GGT CAC TTT GAT ACA AAG ATG GAT GGT	1736		
Gln Arg Asp Trp Thr Ile Leu Gly His Phe Asp Thr Lys Met Asp Gly			
550	555	560	
ACT ACT ACT ATT TCA TGA ACA AAT ACA GCA AGC AAA AGA ACT CTA ACC	1784		
Thr Thr Thr Ile Ser Trp Thr Asn Thr Ala Ser Lys Arg Thr Leu Thr			
565	570	575	
TTA AAT AAA GGT CTA AAT AAA ATT ATT GTA AGT GGA GGA ACT CAA GAT	1832		
Leu Asn Lys Gly Leu Asn Lys Ile Ile Val Ser Gly Gly Thr Gln Asp			
580	585	590	
AAC ACA AAT GCT CCA TTT ATC GGT AAC TTA ACA TTT ACT CTC CAT CTA	1880		
Asn Thr Asn Ala Pro Phe Ile Gly Asn Leu Thr Phe Thr Leu His Leu			
595	600	605	
ACG TAGAACTTC TATTGCAAGC TCTCAATCTG CACAACCACT TAAAAATAGA TG	1935		
Thr			
610			

(2) 配列番号 17 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 32

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示:

TACGTTCTTCCTGGCAAACCTTACCACTACTT

32

(2) 配列番号 18 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 21

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示:

CTACAAAGAACCTAAATATCA

21

(2) 配列番号 19 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 24

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(E) 配列の種類：他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示：

TATAGAATTAAATTTTACTTATTC

24

(2) 配列番号 20 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ：97

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(E) 配列の種類：他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示：

AGCTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTGGCATAT AAATAATAAA TACAATAATT AATTACGCGT 60

AAAAATTGAA AAACATTCTT AATTTATTGC ACTCGTC

97

(2) 配列番号 21 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ：93

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(E) 配列の種類：他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示：

AAAAAAAAA AAAAAAAAAAC CGTATATTTA TTATTTATGT TATTAATTAA TGCGCATTTT 60
 TAACTTTTTG ATAAGATTAA ATAACGTGAG CAG 93

(2) 配列番号 2 2 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ : 95
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (E) 配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示 :

AGCTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTGGCATAT AAATAATAAA TACAATAATT AATTACGCGT 60
 AAAAATTGAA AAACATTCT AATTTATTGC ACTCG 95

(2) 配列番号 2 3 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ : 96
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (E) 配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示 :

AAAAAAAAA AAAAAAAAAA CCGTATATTT ATTATTTATG TTATTAATTA ATGCGCATTT 60
 TTAACTTTTT GATAAGATTA AATAACGTGA GCCTAG 96

(2) 配列番号 24 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 11

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示:

GATCCAGCATG

11

(2) 配列番号 25 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 10

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示:

GTCGTACCTG

10

(2) 配列番号 26 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 21

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(E) 配列の種類：他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示：

GGGATTTCTGAATTCTATGTCT

21

(2) 配列番号 27 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ：2346

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(E) 配列の種類：DNA

(xi) 配列の表示：配列番号 27

AAAAACATCA GATTGTTAAT CTGATATCTT TGCTTAAAAA AACACAAAAT CTTCTAACAA	60
AATCCTAAAT AAATAAGCCG TTAAATTAAC TAAAAAATTA AAAAAATGGT TTTTCTTATC	120
AACCAAAATT CTCTAGTAAT AAACGCTTAT TTATTTTAT TTTTAGTCAT CTTTAAAGAT	180
ATAATATAT CTTAATATTC T ATG AAT AAG AAA AGA ATC ATC TTA AAG ACT	231
Met Asn Lys Lys Arg Ile Ile Leu Lys Thr	
5 10	
ATT AGT TTG TTA GGT ACA ACA TCC TTT CTT AGC ATT GGG ATT TCT AGC	279
Ile Ser Leu Leu Gly Thr Thr Ser Phe Leu Ser Ile Gly Ile Ser Ser	
15 20 25	
TGT ATG TCT ATT ACT AAA AAA GAC GCA AAC CCA AAT AAT GGC CAA ACC	327
Cys Met Ser Ile Thr Lys Lys Asp Ala Asn Pro Asn Asn Gly Gln Thr	
30 35 40	
CAA TTA CAA GCA GCG CGA ATG GAG TTA ACT GAT CTA ATC AAT GCT AAA	375
Gln Leu Gln Ala Ala Arg Met Glu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Ala Lys	
45 50 55	
GCA AGG ACA TTA GCT TCA CTA CAA GAC TAT GCT AAG ATT GAA GCT AGT	423
Ala Arg Thr Leu Ala Ser Leu Gln Asp Tyr Ala Lys Ile Glu Ala Ser	
60 65 70	
TTA TCA TCT GCT TAT AGT GAA GCT GAA ACA GTT AAC AAT AAC CTT AAT	471
Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Glu Ala Glu Thr Val Asn Asn Asn Leu Asn	
75 80 85 90	
GCA ACA CTA GAA CAA CTA AAA ATG GCT AAA ACT AAT TTA GAA TCA GCC	519
Ala Thr Leu Glu Gln Leu Lys Met Ala Lys Thr Asn Leu Glu Ser Ala	
95 100 105	
ATC AAC CAA GCT AAT ACG GAT AAA ACG ACT TTT GAT AAT GAA CAT CCA	567
Ile Asn Gln Ala Asn Thr Asp Lys Thr Thr Phe Asp Asn Glu His Pro	
110 115 120	
AAT TTA GTT GAA GCA TAC AAA GCA CTA AAA ACC ACT TTA GAA CAA CGT	615

Asn Leu Val Glu Ala Tyr Lys Ala Leu Lys Thr Thr Leu Glu Gln Arg	
125 130 135	
GCT ACT AAC CTT GAA GGT TTA GCT TCA ACT GCT TAT AAT CAG ATT CGT	663
Ala Thr Asn Leu Glu Gly Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Ile Arg	
140 145 150	
AAT AAT TTA GTG GAT CTA TAC AAT AAT GCT AGT AGT TTA ATA ACT AAA	711
Asn Asn Leu Val Asp Leu Tyr Asn Asn Ala Ser Ser Leu Ile Thr Lys	
155 160 165 170	
ACA CTA GAT CCA CTA AAT GGG GGA ATG CTT TTA GAT TCT AAT GAG ATT	759
Thr Leu Asp Pro Leu Asn Gly Gly Met Leu Leu Asp Ser Asn Glu Ile	
175 180 185	
ACT ACA GTT AAT CGG AAT ATT AAT AAT ACG TTA TCA ACT ATT AAT GAA	807
Thr Thr Val Asn Arg Asn Ile Asn Asn Thr Leu Ser Thr Ile Asn Glu	
190 195 200	
CAA AAG ACT AAT GCT GAT GCA TTA TCT AAT AGT TTT ATT AAA AAA GTG	855
Gln Lys Thr Asn Ala Asp Ala Leu Ser Asn Ser Phe Ile Lys Lys Val	
205 210 215	
ATT CAA AAT AAT GAA CAA AGT TTT GTA GGG ACT TTT ACA AAC GCT AAT	903
Ile Gln Asn Asn Glu Gln Ser Phe Val Gly Thr Phe Thr Asn Ala Asn	
220 225 230	
GTT CAA CCT TCA AAC TAC AGT TTT GTT GCT TTT AGT GCT GAT GTA ACA	951
Val Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Phe Val Ala Phe Ser Ala Asp Val Thr	
235 240 245 250	
CCC GTC AAT TAT AAA TAT GCA AGA AGG ACC GTT TGG AAT GGT GAT GAA	999
Pro Val Asn Tyr Lys Tyr Ala Arg Arg Thr Val Trp Asn Gly Asp Glu	
255 260 265	
CCT TCA AGT AGA ATT CTT GCA AAC ACG AAT AGT ATC ACA GAT GTT TCT	1047
Pro Ser Ser Arg Ile Leu Ala Asn Thr Asn Ser Ile Thr Asp Val Ser	
270 275 280	
TGG ATT TAT AGT TTA GCT GGA ACA AAC ACG AAG TAC CAA TTT AGT TTT	1095

Trp Ile Tyr Ser Leu Ala Gly Thr Asn Thr Lys Tyr Gln Phe Ser Phe	
285 290 295	
AGC AAC TAT GGT CCA TCA ACT GGT TAT TTA TAT TTC CCT TAT AAG TTG	1143
Ser Asn Tyr Gly Pro Ser Thr Gly Tyr Leu Tyr Phe Pro Tyr Lys Leu	
300 305 310	
GTT AAA GCA GCT GAT GCT AAT AAC GTT GGA TTA CAA TAC AAA TTA AAT	1191
Val Lys Ala Ala Asp Ala Asn Asn Val Gly Leu Gln Tyr Lys Leu Asn	
315 320 325 330	
AAT GGA AAT GTT CAA CAA GTT GAG TTT GCC ACT TCA ACT AGT GCA AAT	1239
Asn Gly Asn Val Gln Gln Val Glu Phe Ala Thr Ser Thr Ser Ala Asn	
335 340 345	
AAT ACT ACA GCT AAT CCA ACT CCA GCA GTT GAT GAG ATT AAA GTT GCT	1287
Asn Thr Thr Ala Asn Pro Thr Pro Ala Val Asp Glu Ile Lys Val Ala	
350 355 360	
AAA ATC GTT TTA TCA GGT TTA AGA TTT GGC CAA AAC ACA ATC GAA TTA	1335
Lys Ile Val Leu Ser Gly Leu Arg Phe Gly Gln Asn Thr Ile Glu Leu	
365 370 375	
AGT GTT CCA ACG GGT GAA GGA AAT ATG AAT AAA GTT GCG CCA ATG ATT	1383
Ser Val Pro Thr Gly Glu Gly Asn Met Asn Lys Val Ala Pro Met Ile	
380 385 390	
GGC AAC ATT TAT CTT AGC TCA AAT GAA AAT AAT GCT GAT AAG ATC TAC	1431
Gly Asn Ile Tyr Leu Ser Ser Asn Glu Asn Asn Ala Asp Lys Ile Tyr	
395 400 405 410	
AAT GAT ATC TTT GGT AAC ACA ATC AAC CAA CAG AAT AAT GCT ATT TCT	1479
Asn Asp Ile Phe Gly Asn Thr Ile Asn Gln Gln Asn Asn Ala Ile Ser	
415 420 425	
GTA ATG GTT AAT ATG GTT GAG GGA TAT AAT TTA GCT AGT AGT TAT TCT	1527
Val Met Val Asn Met Val Glu Gly Tyr Asn Leu Ala Ser Ser Tyr Ser	
430 435 440	
CCA GCA TAT AAA CCA ATT AAT GTT TCC ACT GGT GGT GGT CAA ACT CAA	1575

Pro Ala Tyr Lys Pro Ile Asn Val Ser Thr Gly Gly Gly Gln Thr Gln	
445 450 455	
CCA TAT TAT GTA ATT GGT TGA TTG GGC GCT AGT GAT CAG AAC CCT AGA	1623
Pro Tyr Tyr Val Ile Gly Trp Leu Gly Ala Ser Asp Gln Asn Pro Arg	
460 465 470	
AAC GCT GTG GGA ACC AAC ATG AAC GTA CAA AGA GTT CCA GCA ACA AAT	1671
Asn Ala Val Gly Thr Asn Met Asn Val Gln Arg Val Pro Ala Thr Asn	
475 480 485 490	
AGC AAC CAA GGC GGA TAT GCT AGA TAT GTC TCT TTT TAT GTT AAT GCT	1719
Ser Asn Gln Gly Gly Tyr Ala Arg Tyr Val Ser Phe Tyr Val Asn Ala	
495 500 505	
CCA CAA GCT GGT TCA TAT TAT ATT AGT GGT AAC TAT AAT AGT TTA ACA	1767
Pro Gln Ala Gly Ser Tyr Tyr Ile Ser Gly Asn Tyr Asn Ser Leu Thr	
510 515 520	
GCT AGA GGT CTA GCT GTG TCT ACT GAG AAA ACA TTT ACA ACC AAT GTG	1815
Ala Arg Gly Leu Ala Val Ser Thr Glu Lys Thr Phe Thr Thr Asn Val	
525 530 535	
ATC AAG ATC ACT CAC TTA CAA GTA ATT AAT GCC ACT AAT AGA ATC TTA	1863
Ile Lys Ile Thr His Leu Gln Val Ile Asn Ala Thr Asn Arg Ile Leu	
540 545 550	
ACC TTT GAT ACT AAA ACA AAA AGA GGA ACT GAT AGT AAT AAC GGT AAT	1911
Thr Phe Asp Thr Lys Thr Lys Arg Gly Thr Asp Ser Asn Asn Gly Asn	
555 560 565 570	
ATT ACA TTA GAA GCA AAC AAA GAC ACA ATA ACA TTA ACT AAG GGT TGA	1959
Ile Thr Leu Glu Ala Asn Lys Asp Thr Ile Thr Leu Thr Lys Gly Trp	
575 580 585	
AAC AAA CTT TAT GTT TCA GGT AAT AAT AAT GAC AGT GTA GGT ATT GGT	2007
Asn Lys Leu Tyr Val Ser Gly Asn Asn Asn Asp Ser Val Gly Ile Gly	
590 595 600	
AAT CTT ACT TTT ACA TTA ATG CCA CCA CAA ACT AAT TCA TAATTAAGAT	2056

Asn	Leu	Thr	Phe	Thr	Leu	Met	Pro	Pro	Gln	Thr	Asn	Ser	
	605					610					615		
ATATTAAACA	TACCCATTTA	GATAATCTAA	ATGGGTATCT	TTTTTATTGA	AAATGGCGCA								2116
TGATGAAATC	AAAGTTAAGT	TCACTAGTGC	TTTGATAAAT	TAGATCAGCT	TTAGAANNAT								2176
CTTCACTACT	GCCATGGGTA	ATGACAACAG	CTTTCATTTT	GNCTGCTTCG	ATCGCTTTCA								2236
ATCCTGAGAT	CGCATCTTCA	AACCCAATAN	CTTNATCATT	GCTGATATCT	AAGTCTTCTN								2296
CAGCTTTAAG	ATAGATATCA	GCTNCTGGTT	TACCTTGGTT	AATCTCACTT									2346

(2) 配列番号 28 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 17

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 28

GTTTTCCCAGTCACGAC

17

(2) 配列番号 29 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 27

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 29

AACCAACCAACCCGATCGCTAGTCT

27

(2) 配列番号 30 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 20

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 30

TGATTGGGCGCTAGCGATCA

20

(2) 配列番号 31 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 23

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 31

TCCCAACCTTGTTGAAATACAA

23

(2) 配列番号 32 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 19

- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 DNA
- (xi) 配列の表示: 配列番号 3 2

TGAAACAAGCTTTATGTTT

19

(2) 配列番号 3 3 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 17
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 DNA
- (xi) 配列の表示: 配列番号 3 3

CAGTATCGACAAAGGAC

17

(2) 配列番号 3 4 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 17
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
- (xi) 配列の表示: 配列番号 3 4

CAGGAAACAGCTATGAC

17

(2) 配列番号 3 5 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ : 20

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(E) 配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示 : 配列番号 3 5

GTTCTTCCTGGCAAACCTTA

20

(2) 配列番号 3 6 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ : 20

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(E) 配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示 : 配列番号 3 6

AAGAAGGACCGTTTGGAATG

20

(2) 配列番号 3 7 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ : 17

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 3 7

GTTTTCCCAGTCACGAC

17

(2) 配列番号 3 8 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 27

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 3 8

CAAAGTACCTAAATATCGAATTACCT

27

(2) 配列番号 3 9 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 23

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 3 9

ATAGCTTAAGTGGAACAAACACG

23

(2) 配列番号 4 0 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ : 20

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(E) 配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示 : 配列番号 4 0

GGAACCAGATCTTGTTTCCC

20

(2) 配列番号 4 1 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ : 21

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(E) 配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の表示 : 配列番号 4 1

GGTCTAGAACAAAGGGATTGGACA

21

(2) 配列番号 4 2 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ : 20

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 4 2

CTACCTACCATGGTGATGAT

20

(2) 配列番号 4 3 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 27

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 4 3

GATGGTACCACTACTATTTTCATGGACA

27

請求の範囲

1. マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組み換えアビポックスウイルス。

2. マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAの末端側に、更に鳥類に感染するウイルスのタイプII外膜タンパク質のシグナル膜アンカーをコードするDNAを組み込んだ請求項1記載の組み換えアビポックスウイルス。

3. シグナル膜アンカーをコードするDNAがニューカッスル病ウイルスのヘマグルチニン・ノイラミニダーゼのシグナル膜アンカーをコードするDNAである請求項2記載の組み換えアビポックスウイルス。

4. 組み込んだ抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAがマイコプラズマ・ガリセプティカム免疫血清またはマイコプラズマ・ガリセプティカム感染血清に反応しうる実質的に純粋な抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAであって、その塩基配列が配列1、配列14、配列15、配列16または配列27に示されたものである請求項1、2または3に記載の組み換えアビポックスウイルス。

5. DNAが配列14または配列15に記載の塩基配列またはそれと実質的に同一の機能を持つ塩基配列を有するものである請求項1または2記載の組み換えアビ

ボックスウイルス。

6. 請求項 1, 2, 3, 4 または 5 記載の組み換えアビボックスウイルスを有効成分とした抗家禽マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症用組み換え生ワクチン。

7. マイコプラズマ・ガリセプティカム免疫血清またはマイコプラズマ・ガリセプティカム感染血清に反応しうる実質的に純粋な抗原タンパク質であって、第 1 図に示される制限酵素切断点地図を有するマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の遺伝子がコードする抗原タンパク質、またはそれと同等の免疫性を示す限りにおいて修飾されていてもよい抗原タンパク質。

8. 請求項 7 記載の抗原タンパク質をコードする遺伝子。

9. マイコプラズマ免疫血清またはマイコプラズマ感染血清に反応しうる実質的に純粋な抗原タンパク質であって、第 7 図に示される制限酵素切断点地図を有するマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の遺伝子がコードする抗原タンパク質、またはそれと同等の免疫性を示す限りにおいて修飾されていてもよい抗原タンパク質。

10. 請求項 9 記載の抗原タンパク質をコードする DNA。

11. マイコプラズマ・ガリセプティカム免疫血清またはマイコプラズマ・ガリセプティカム感染血清に反応しうる実質的に純粋な抗原タンパク質であって、第 8 図に示される制限酵素切断点地図を有するマイコプラズマ

・ ガリセプティカム由来の遺伝子がコードする抗原タンパク質、またはそれと同等の免疫性を示す限りにおいて修飾されていてもよい抗原タンパク質。

1 2 . 請求項 1 1 記載の抗原タンパク質をコードする遺伝子。

1 3 . マイコプラズマ免疫血清またはマイコプラズマ感染血清に反応しうる実質的に純粋な抗原タンパク質であって、第 1 0 図に示される制限酵素切断点地図を有するマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の遺伝子がコードする抗原タンパク質、またはそれと同等の免疫性を示す限りにおいて修飾されていてもよい抗原タンパク質。

1 4 . 請求項 1 3 記載の抗原タンパク質をコードする DNA。

1 5 . マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチドの 5' - 末端側に鳥類に感染するウイルスのタイプ I 1 外膜タンパク質のシグナル膜アンカーが連結していることを特徴とする融合タンパク質。

1 6 . シグナル膜アンカーがニューカッスル病ウイルスのヘマグルチニン・ノイラミニダーゼのシグナル膜アンカーである請求項 1 1 記載の融合タンパク質。

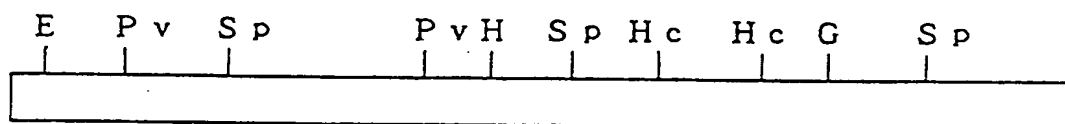
1 7 . 請求項 1 5 記載の融合タンパク質をコードするハイブリッド DNA。

1 8 . 請求項 7 , 9 , 1 1 , 1 3 , 1 5 または 1 6 に記載のタンパク質を有効成分とするコンポネントワクチン。

1 / 18

FIG. 1

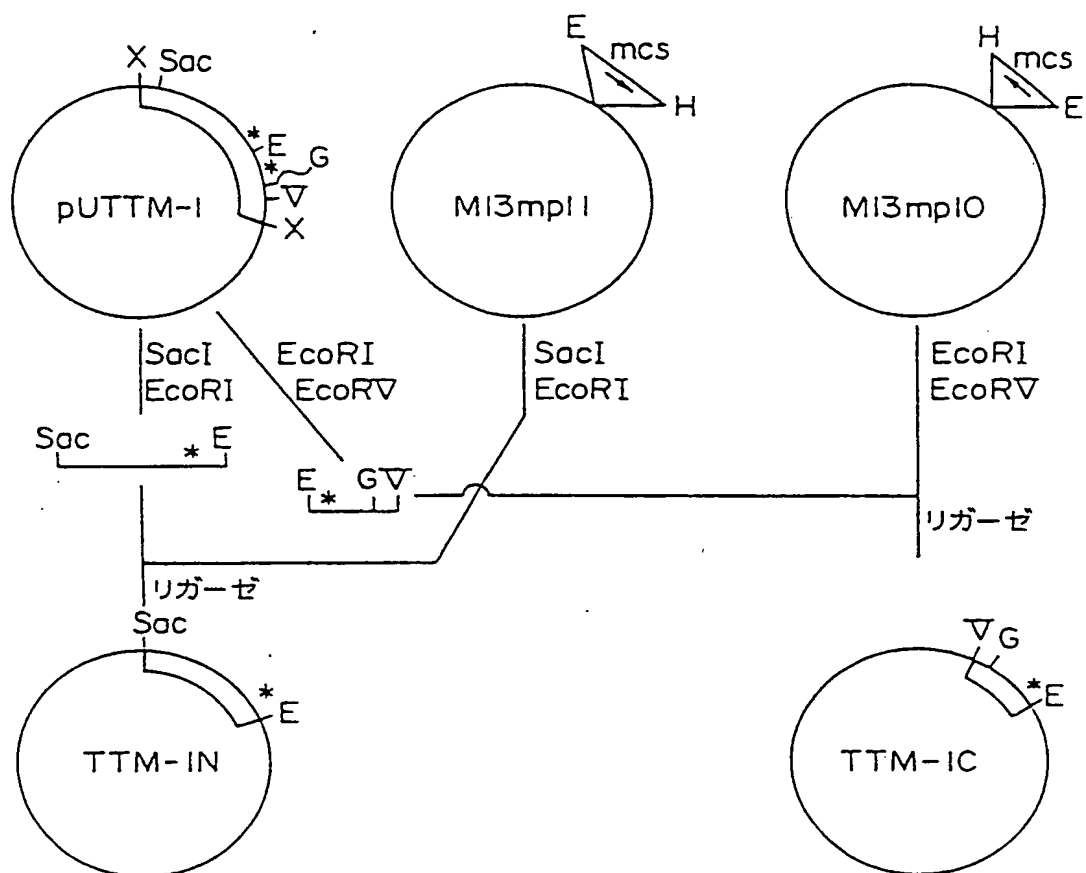
(TM-81の制限酵素切断点地図)



E: EcoRI、Pv: PvuII、Sp: SmaI、H: HindIII
Hc: HincII、G: BglII

2/18

FIG. 2



E : EcoRI

▽ : EcoRV

G : Bgl II

Sac : SacI

X : XbaI

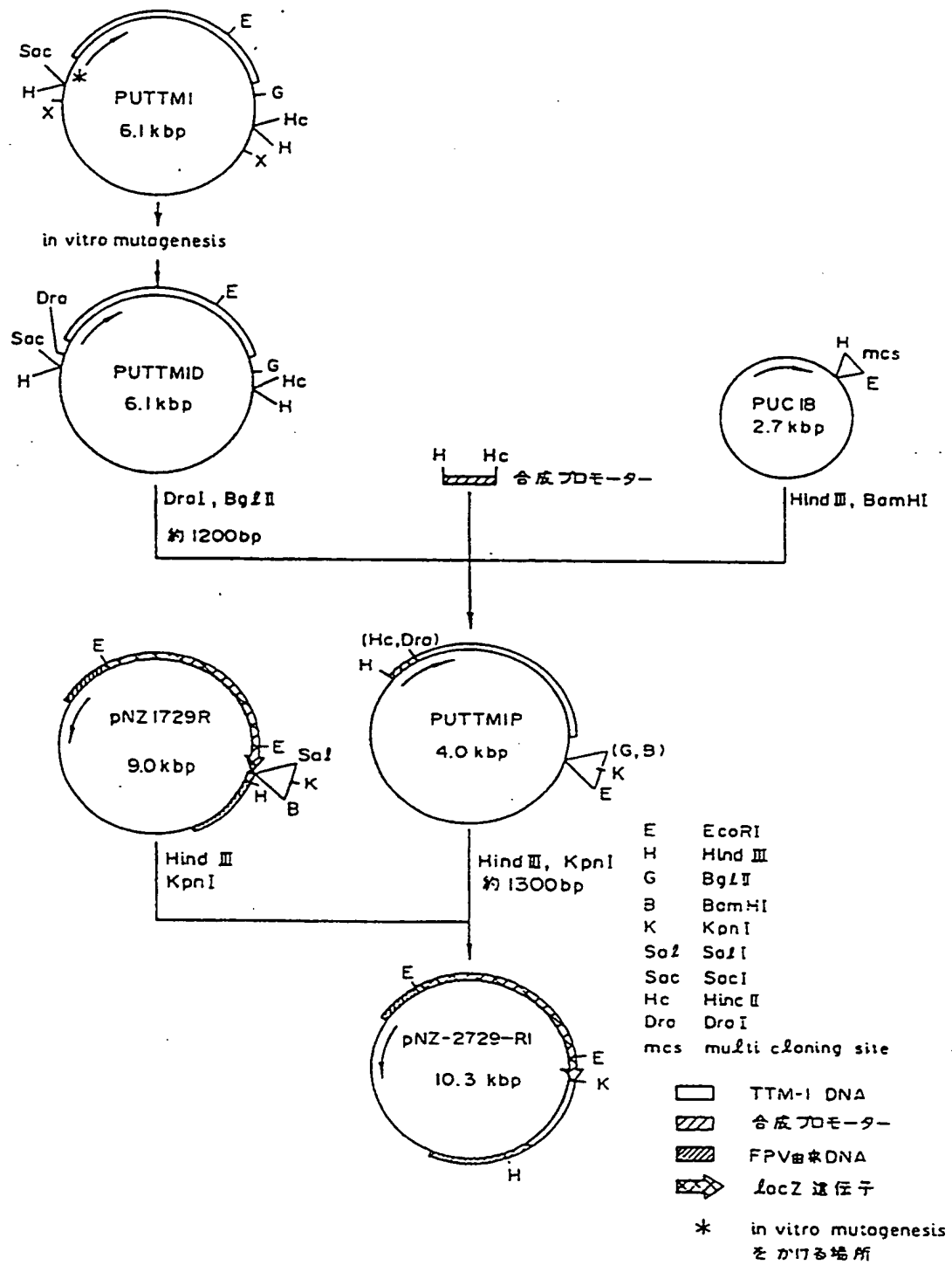
Ss : SspI

Sp : SpeI

* 変異をかけるヌクレオチドの位置

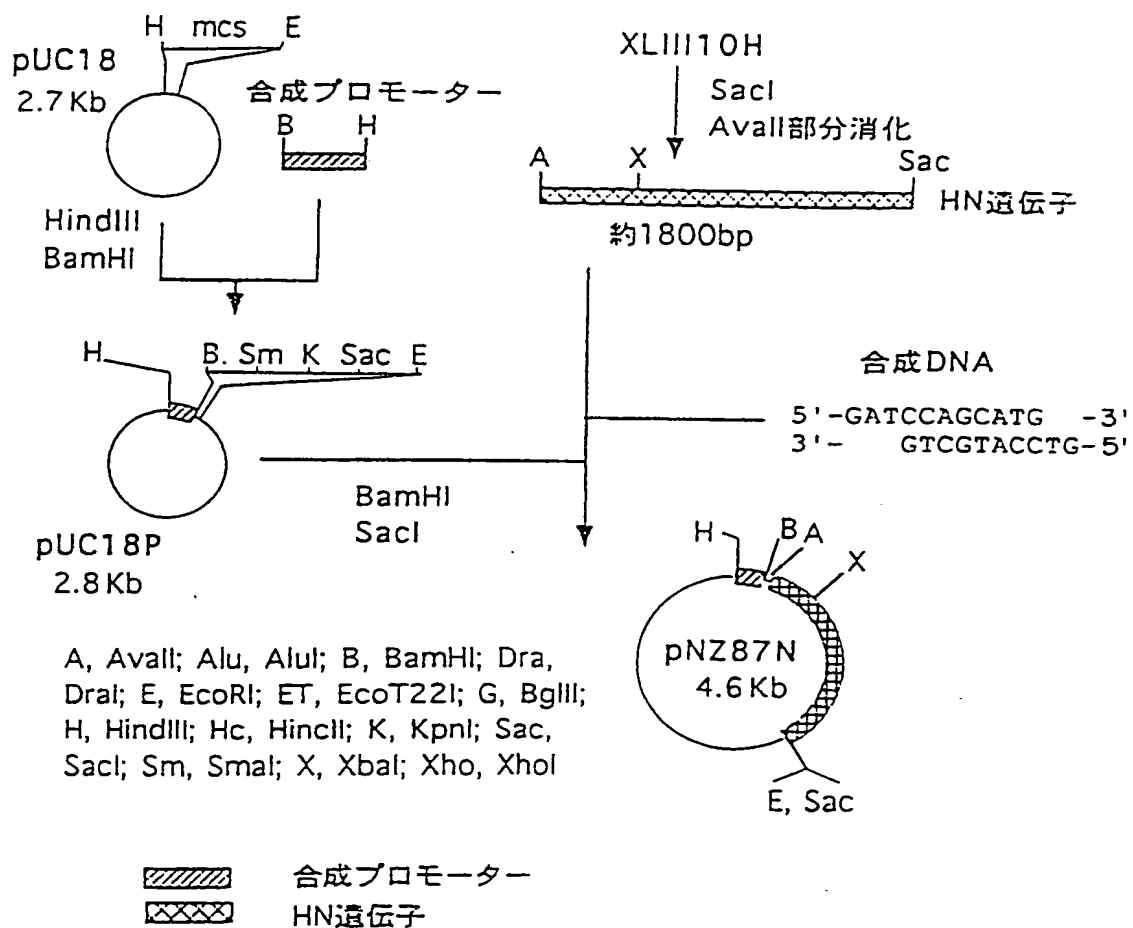
3/18

FIG. 3



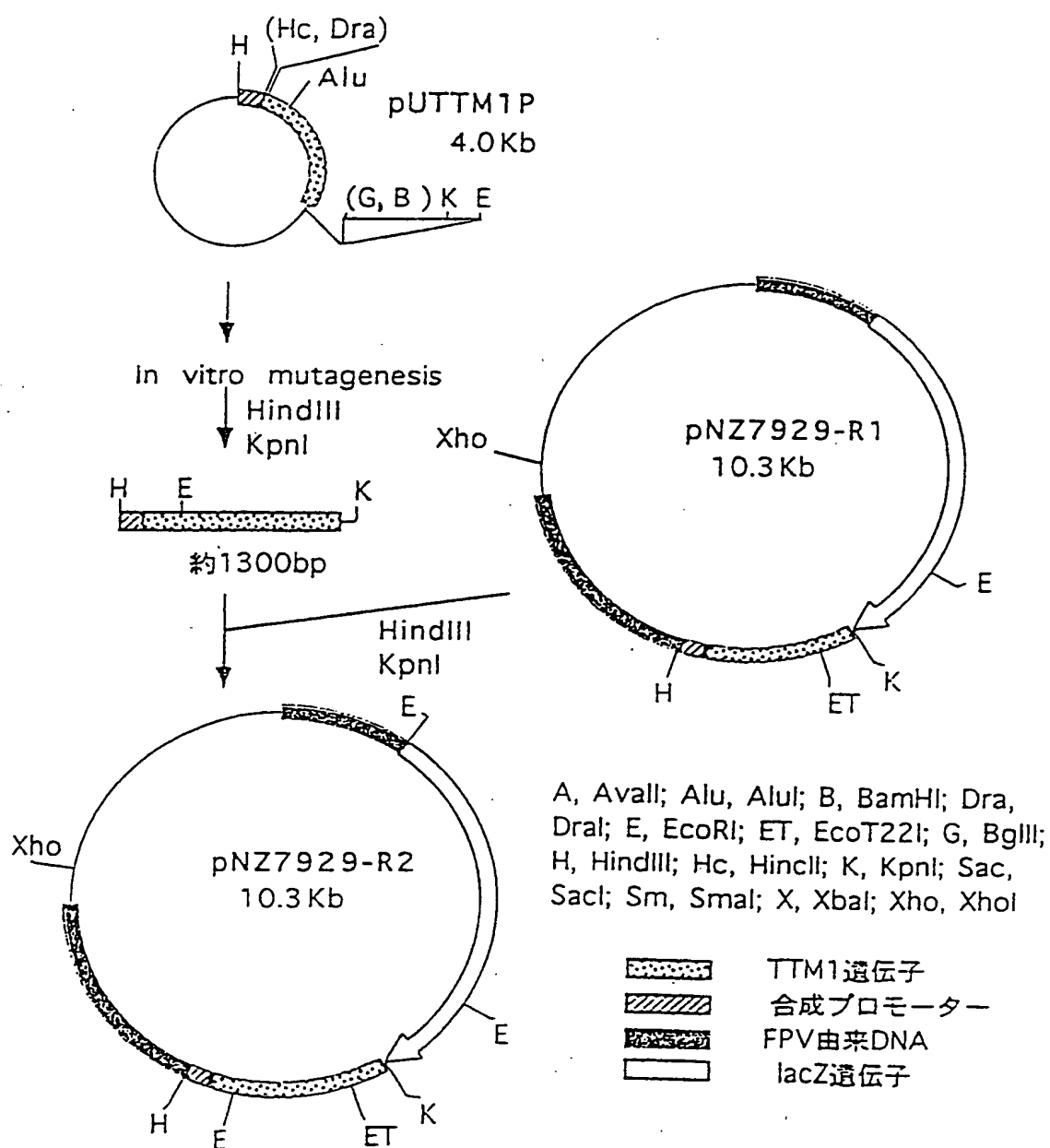
4/18

FIG. 4



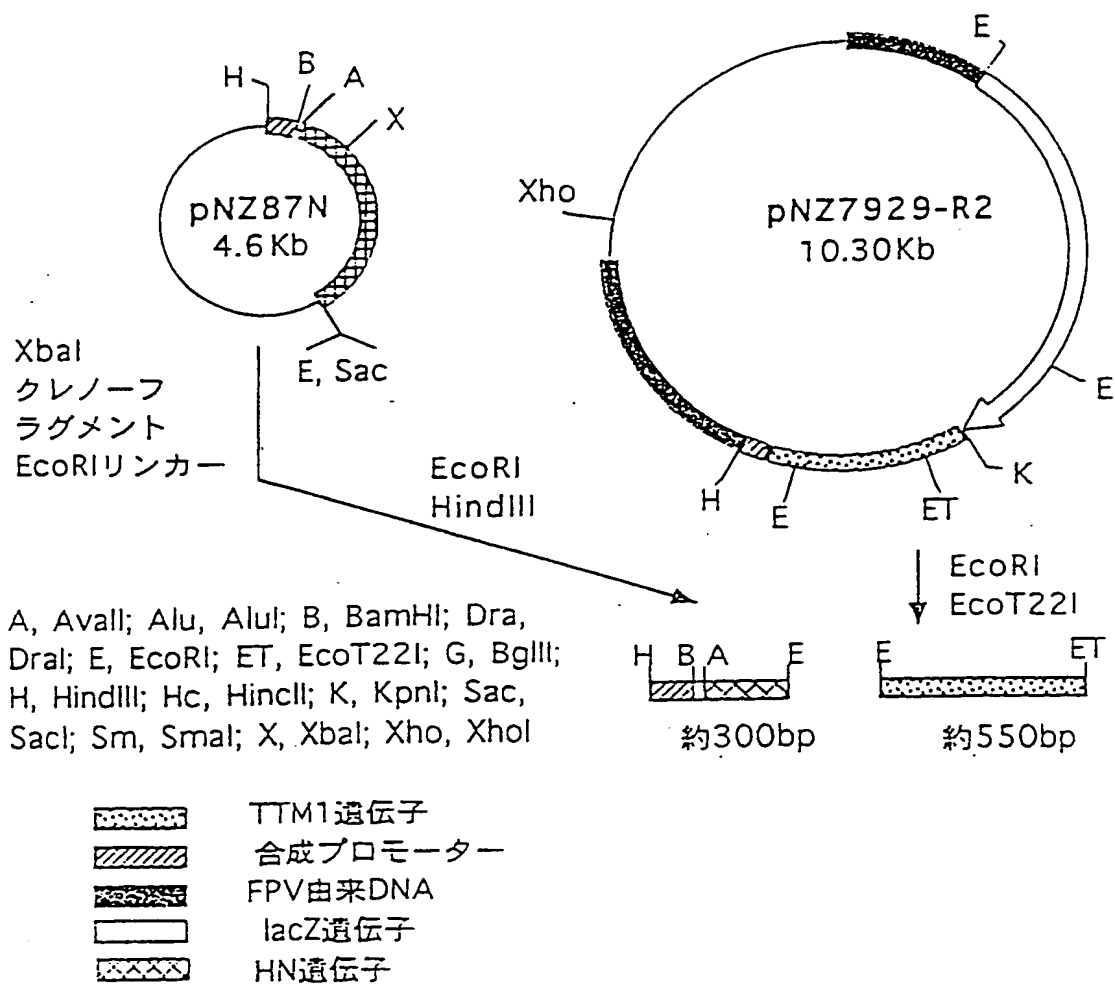
5/18

FIG. 5



6/18

FIG. 6(A)



7/18

FIG. 6(B)

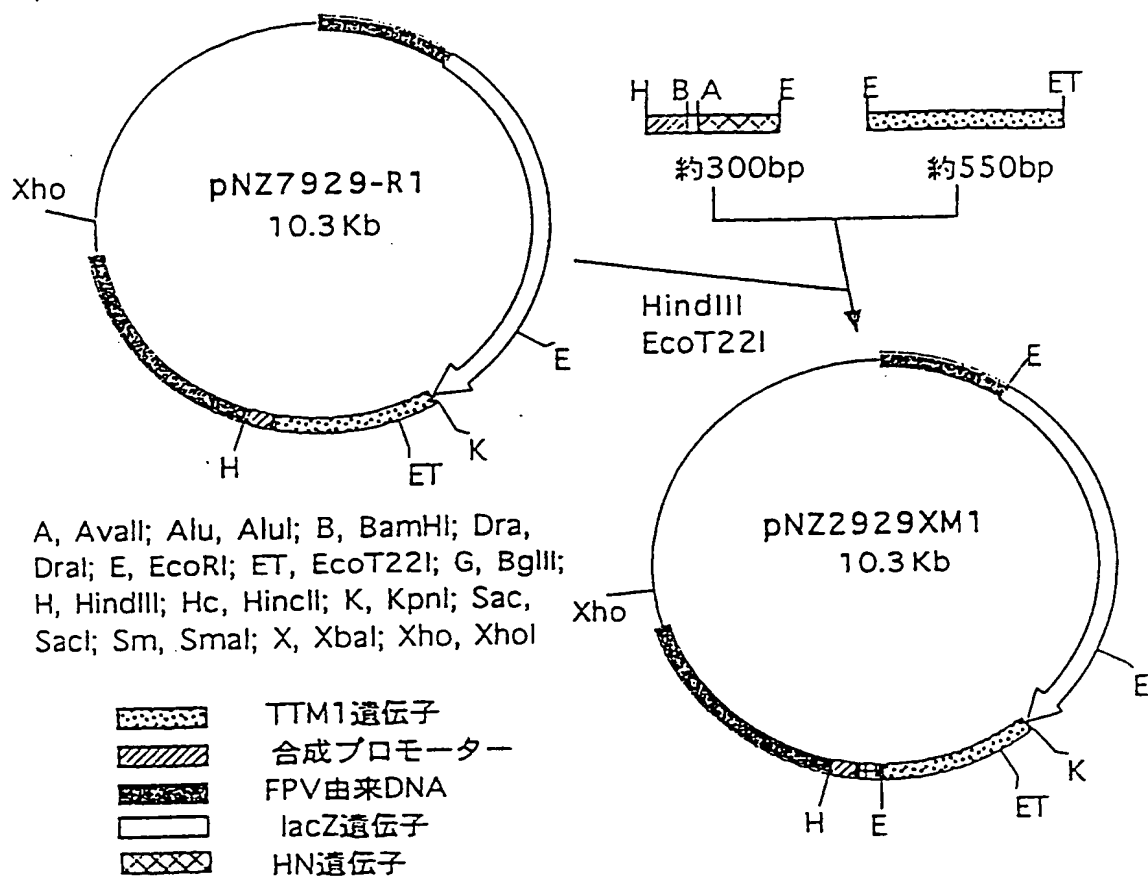
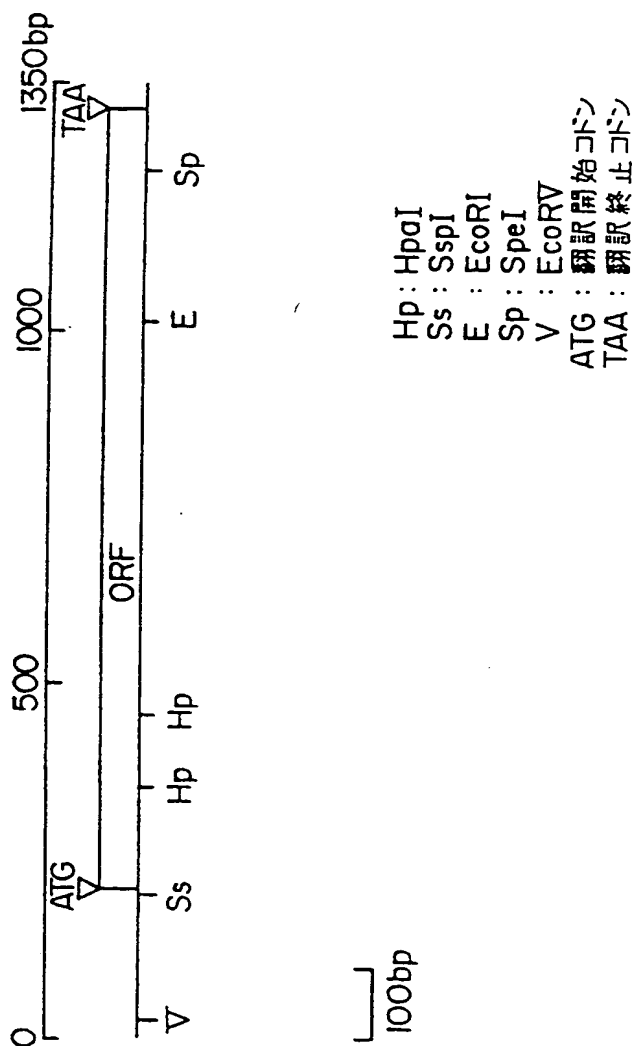


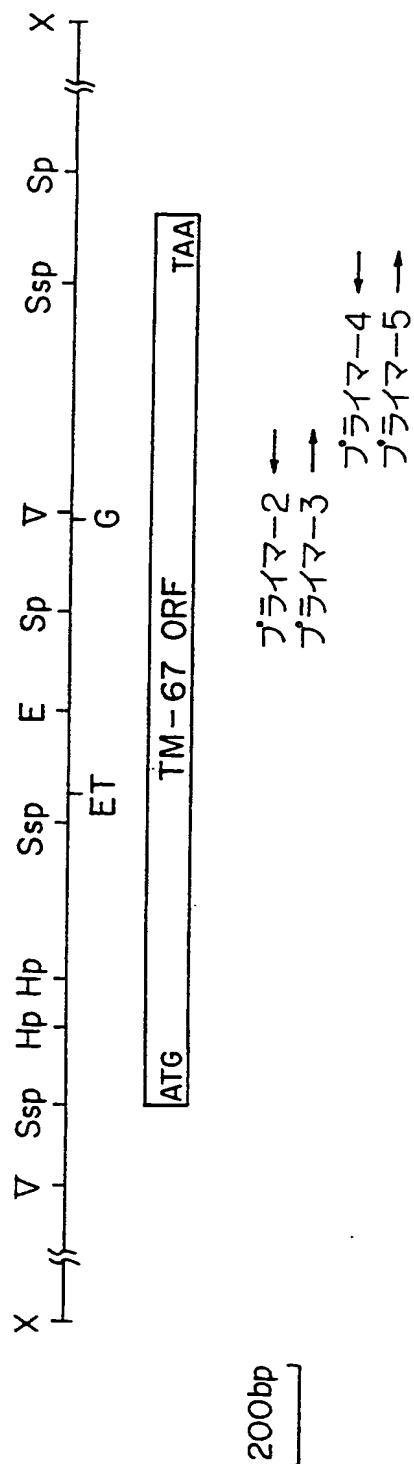
FIG. 7



9 / 18

FIG. 8

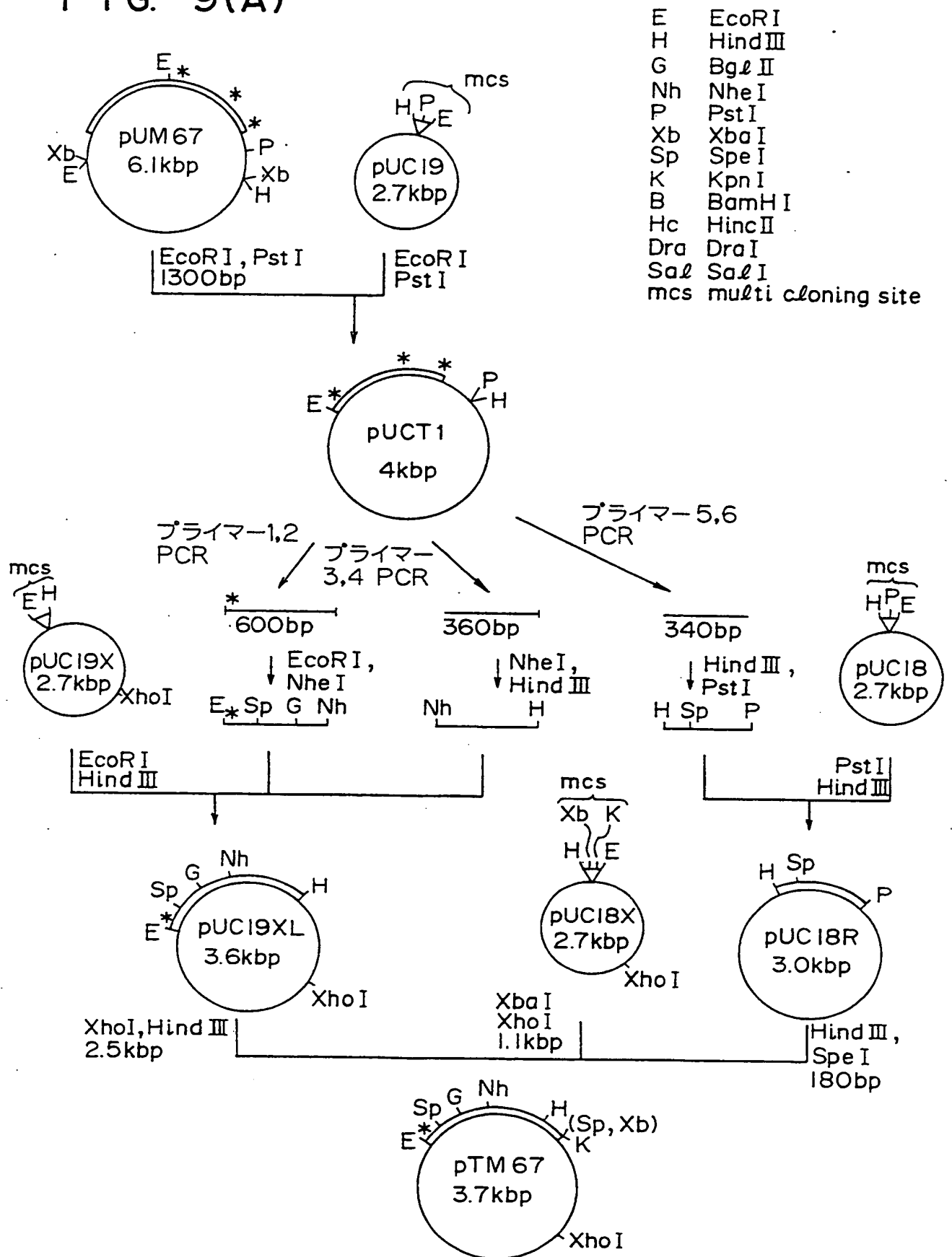
TM-67 ORFの制限酵素切断点地図と合成プライマーのORF上の位置



E: EcoRI, G: BglII, Ssp: SspI, Hp: HpaI,
 V: EcoRV, Sp: SpeI, ET: EcoT22I

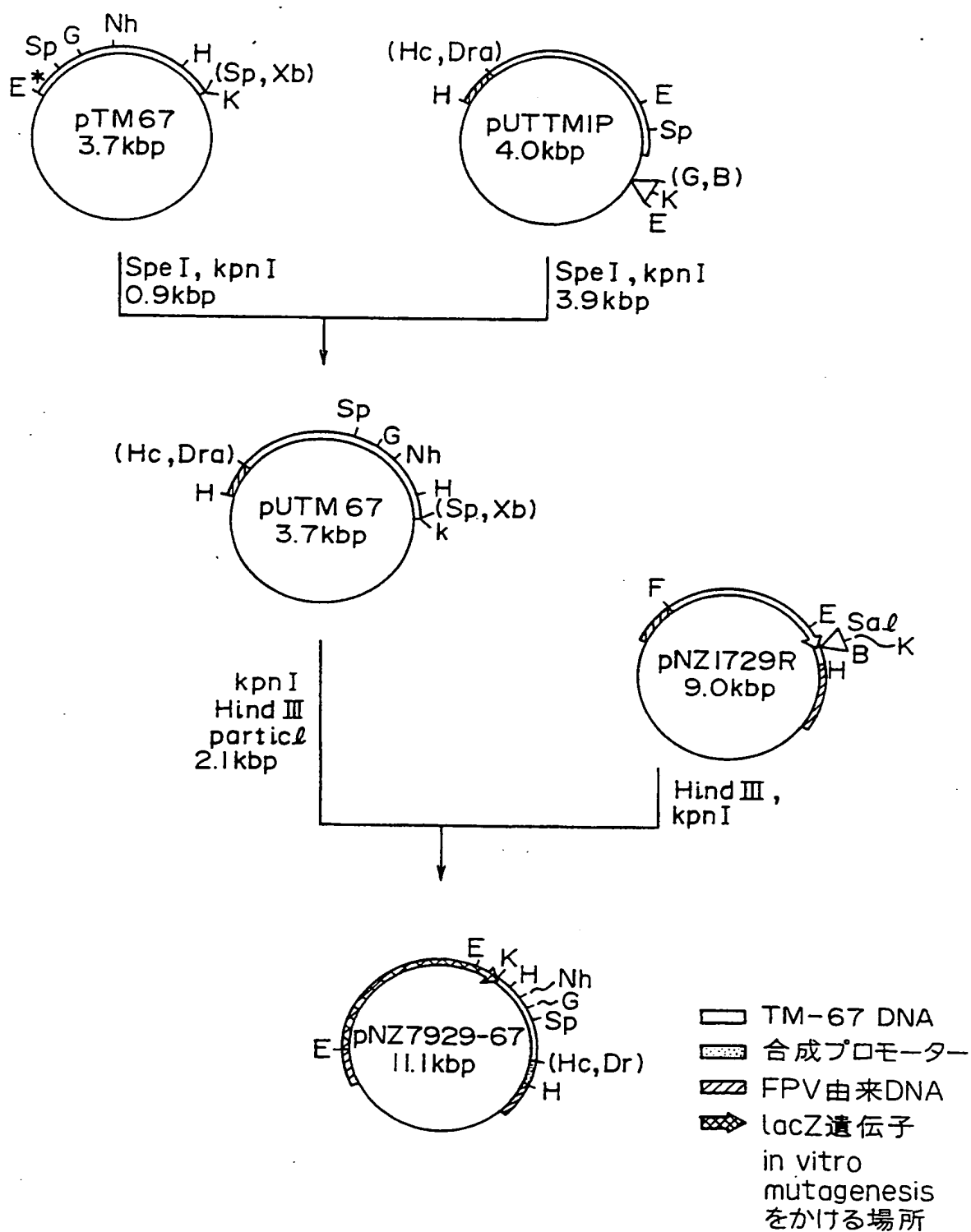
10/18

FIG. 9(A)



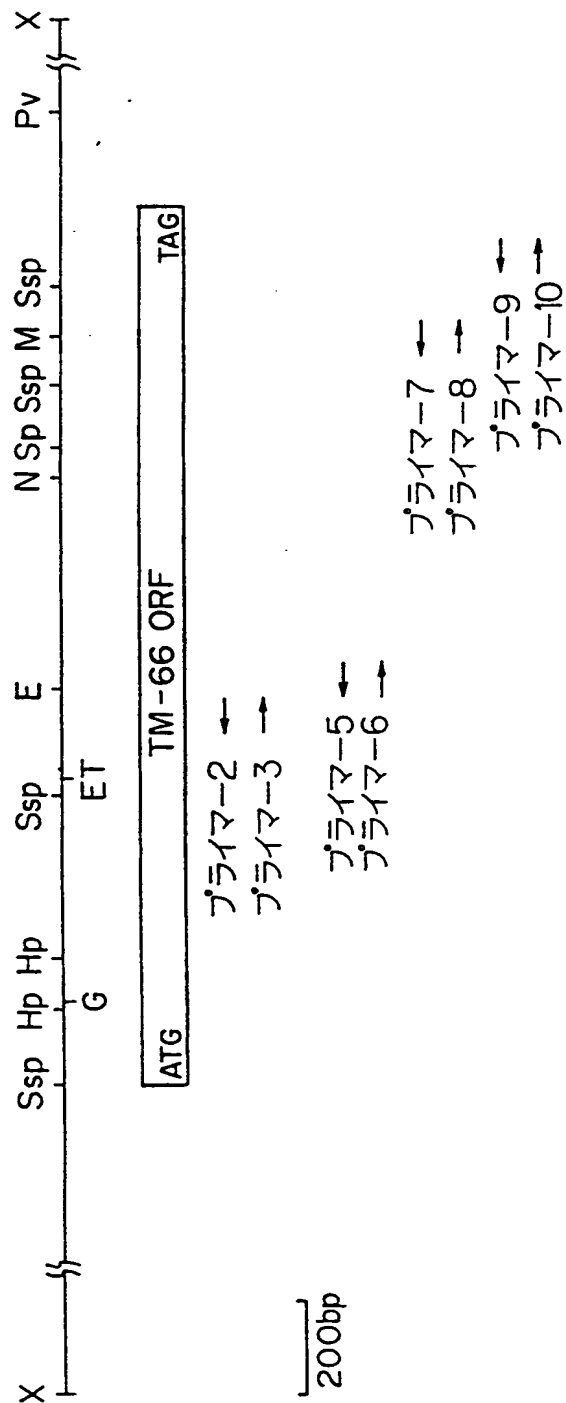
11/18

FIG. 9(B)



12 / 18

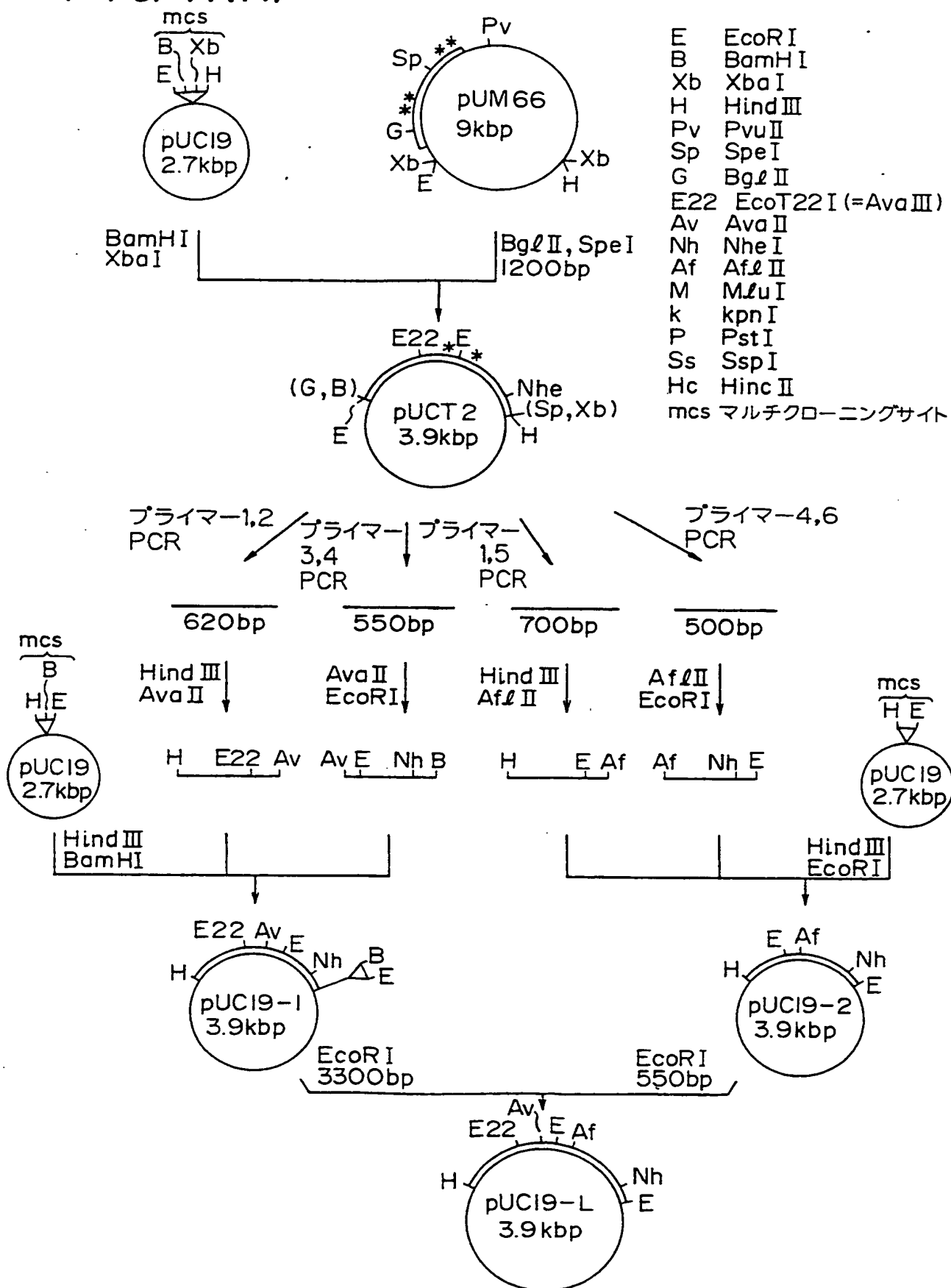
FIG. 10 TM-66 ORFの制限酵素切断点地図と合成プライマーのORF上の位置



E: EcoRI, G: BglII, Ssp: SspI, Hp: HpaI, X: XbaI
 N: NheI, Sp: SpeI, ET: EcoT221, M: MluI, Pv: PvuII

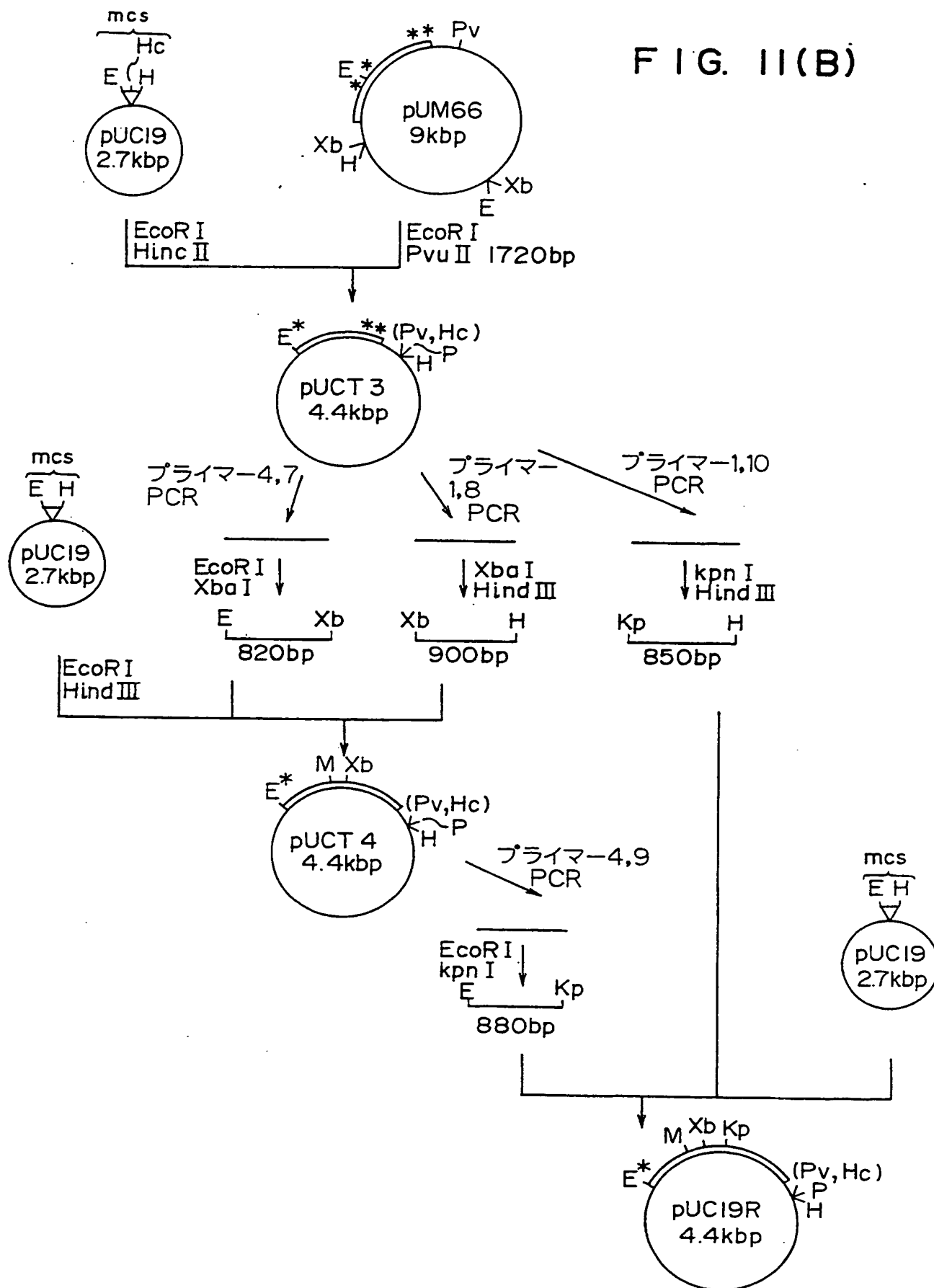
FIG. 11(A)

13/18



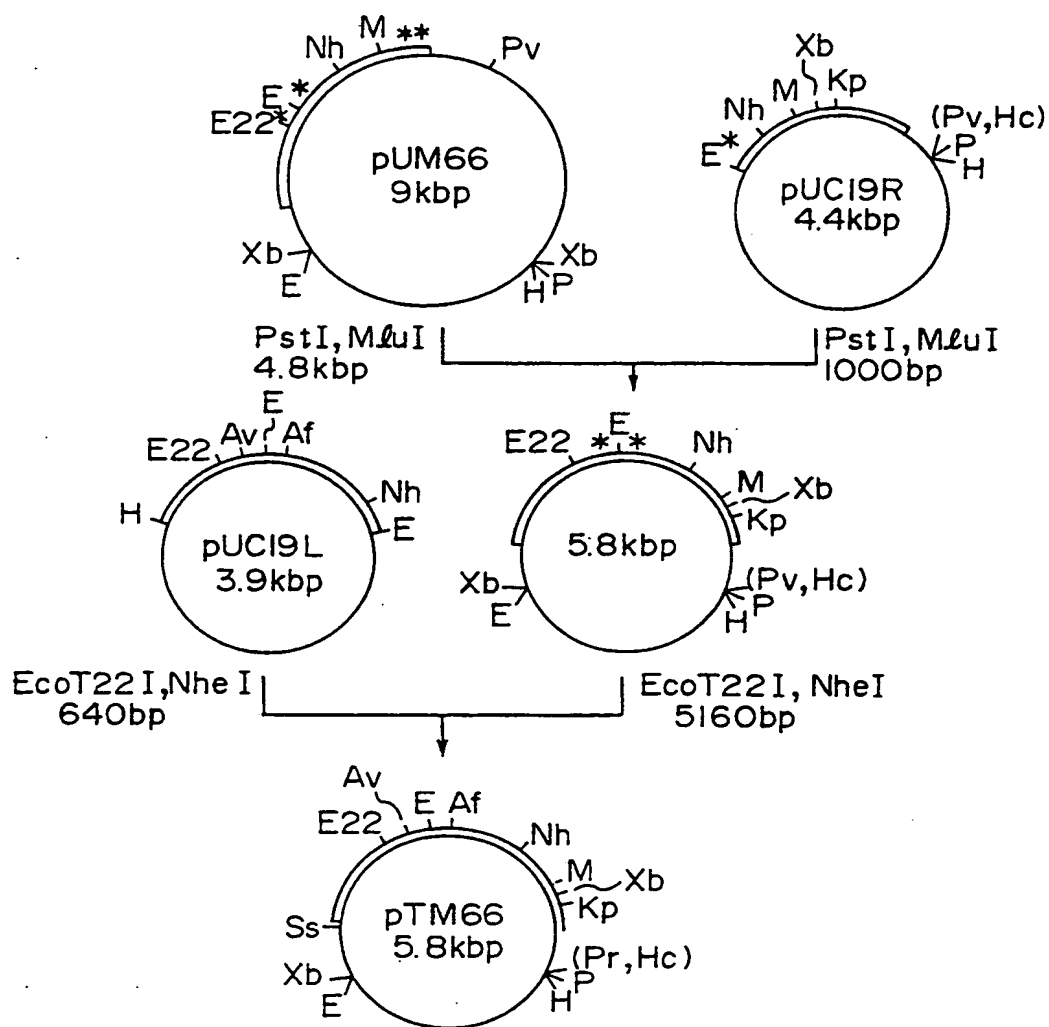
14 / 18

FIG. 11(B)



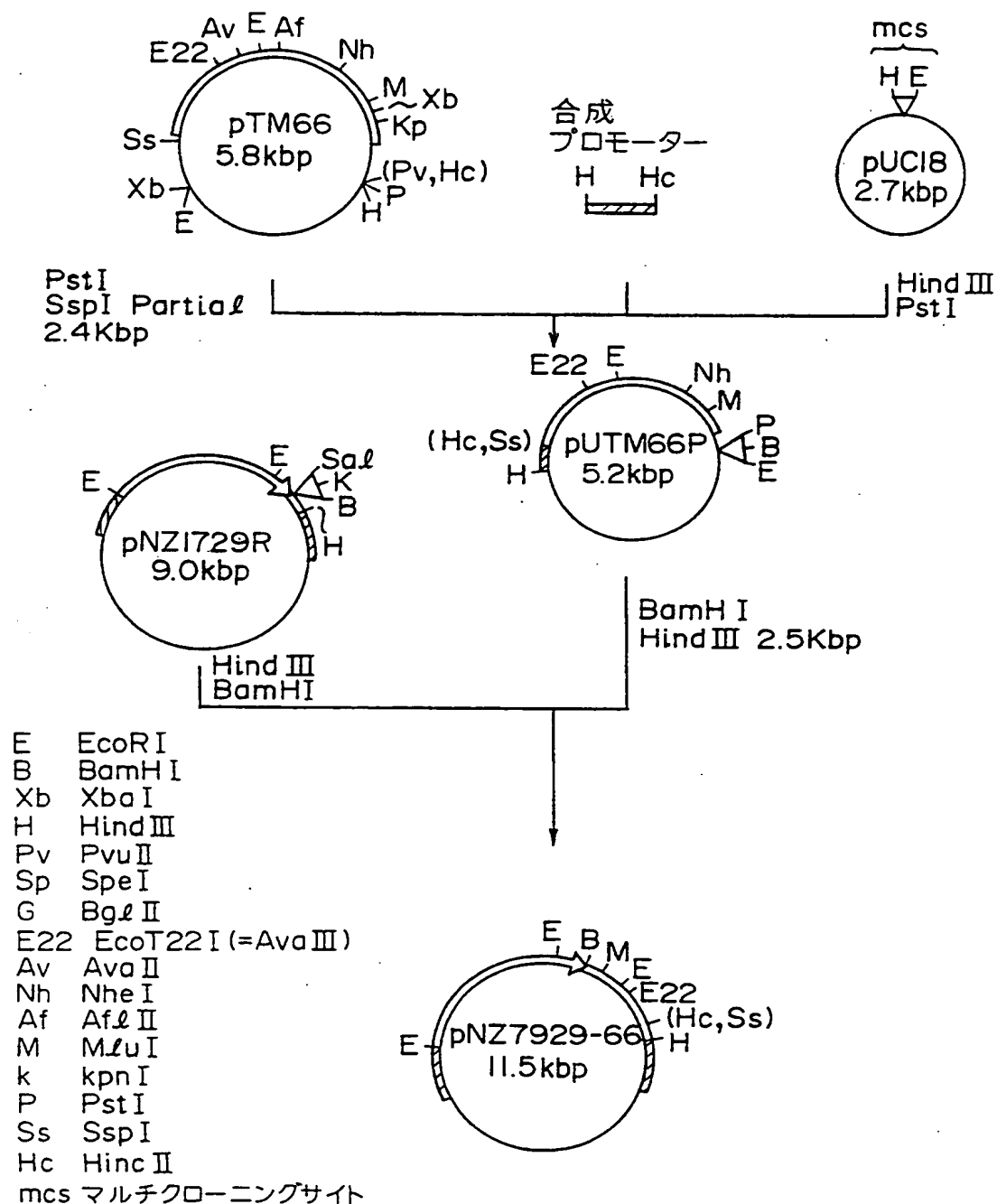
15/18

FIG. II(C)



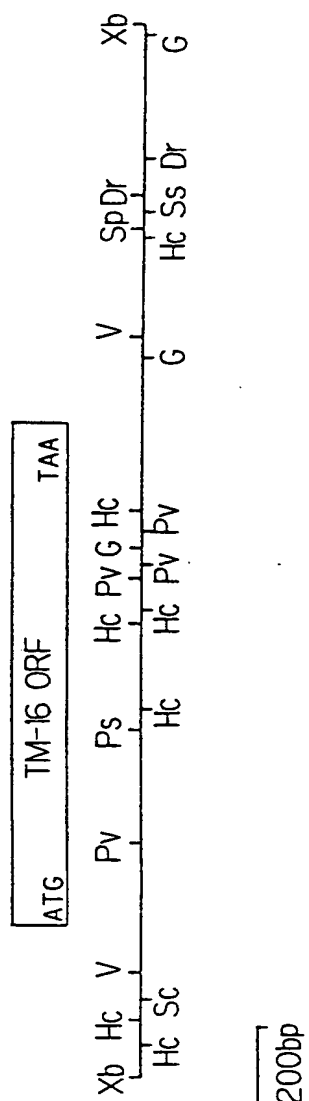
16/18

FIG. 12



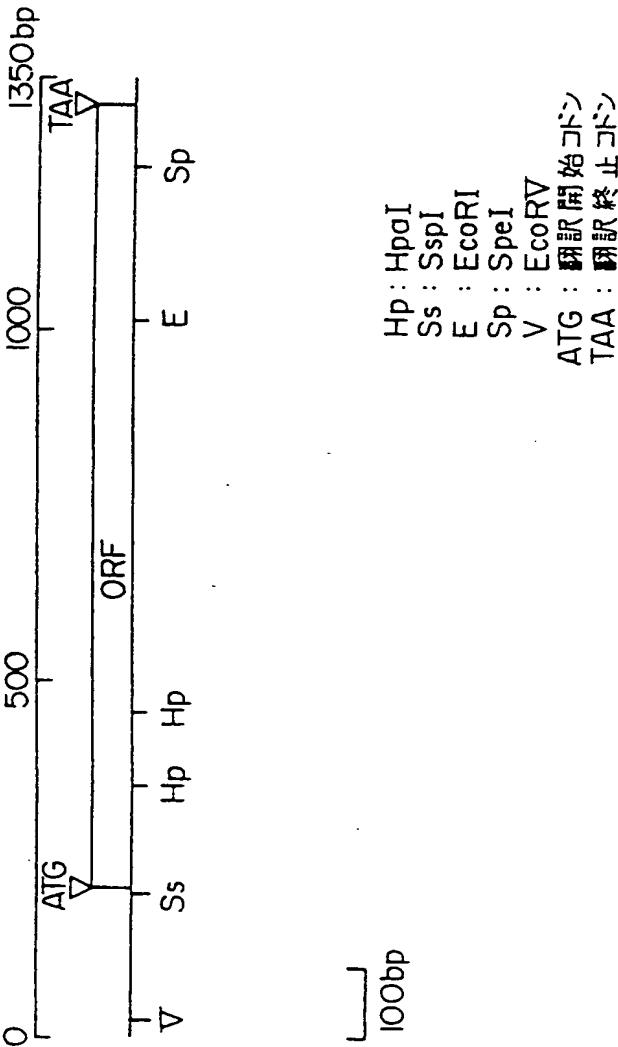
17 / 18

FIG. 13



Hc:Hinc II.Pv:Pvu II.Ps:Pst I.G:Bgl II

FIG. 14



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/00541

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁵ C12N7/01, C12N15/31, C12N15/62, C12P21/02, C07K7/10,
A61K39/02// (C12P21/02, C12R1:92)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁵ C12N7/01, C12N15/31, C12N15/62, C12P21/02, C07K7/10,
A61K39/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS PRE VIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 1-168279 (Nippon Zeon Co., Ltd.), July 3, 1989 (03. 07. 89) & EP, A, 284416 & AU, A, 8813766	1-7, 9, 11, 13, 15-16, 18
Y	JP, A, 2-111795 (Nippon Zeon Co., Ltd., Shionogi & Co., Ltd.), April 24, 1990 (24. 04. 90), (Family: none)	1-3, 6-18
Y	Molecular and Cellular Biology, volume 10, No. 2, (1990), Wilson C. et al.: "Abenent membrane insertion of a cytoplasmic tail deletion mutant of the hemagglutinin- neuraminidase glycoprotein of newcastle disease virus", see P. 449-457	2-7, 9, 11, 13, 15-18
Y	WO, A, 9324646 (Nippon Zeon Co., Ltd., Shionogi & Co., Ltd.), December 9, 1993 (09. 12. 93) & AU, A, 9340903	1-6, 15, 17-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 20, 1994 (20. 06. 94)

Date of mailing of the international search report

July 12, 1994 (12. 07. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N7/01, C12N15/31, C12N15/62,
C12P21/02, C07K7/10, A61K39/02//
(C12P21/02, C12R1:92)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N7/01, C12N15/31, C12N15/62,
C12P21/02, C07K7/10, A61K39/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, BIOSIS PRE VIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, A, 1-168279 (日本ゼオン株式会社), 3. 7月. 1989 (03. 07. 89) & EP, A, 284416 & AU, A, 8813766	1-7, 9, 11, 13, 15-16, 18
Y	JP, A, 2-111795 (日本ゼオン株式会社, 塩野義製薬 株式会社), 24. 4月. 1990 (24. 04. 90) (ファミリーなし)	1-3, 6-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 06. 94

国際調査報告の発送日

12.07.94

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Molecular and Cellular Biology, volume 10, No 2, (1990), Wilson C. et al.: "Abenent membrane insertion of a cytoplasmic tail deletion mutant of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of newcastle disease virus", see p.449-457	2-7, 9, 11, 13, 15-18
Y	WO, A, 9324646 (日本ゼオン株式会社, 塩野義製薬株式会社), 9. 12月. 1993 (09. 12. 93) & AU, A, 9340903	1-6, 15, 17-18